

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik  
der GSF München  
(Leiter: Prof. G.W. Bornkamm)  
angefertigt unter der Anleitung von Dr. M. Brielmeier

vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am  
Institut für Tierpathologie  
der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Charakterisierung der Selenoproteine  
Thioredoxinreduktase 1 und 2  
anhand von  
Knock-out-Mausmodellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Cemile Jakupoglu  
aus  
München

München, 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
1. Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
2. Referent:	Prof. Dr. J. Wittmann
1. Korreferent:	Prof. Dr. E. Wolf
2. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. B. Aigner
3. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Tag der Promotion: 18.Juli 2003

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Selen.....	6
1.2 Selenoproteine.....	7
1.2.1 Begriffsdefinition .....	7
1.2.2 Selenocystein Insertionsmechanismus .....	9
1.3 Thioredoxinreduktasen.....	12
1.3.1 Struktur der Thioredoxinreduktasen.....	12
1.3.2 Expression der Thioredoxinreduktasen.....	14
1.3.3 Das Redoxenzym Thioredoxinreduktase .....	16
1.3.4 Thioredoxin .....	19
1.3.5 TR1 und Tumor .....	21
1.4 Die Laboratoriumsmaus als Tiermodell.....	23
1.4.1 Gezielt genetisch veränderte Mauslinien .....	23
1.4.2 Reproduktionsphysiologie und pränatale Letalität der Maus.....	25
1.5 Fragestellung.....	27
2 Material.....	28
2.1 Chemikalien.....	28
2.2 Radioaktive Isotope .....	29
2.3 Enzyme.....	29
2.4 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	29
2.5 Materialien für die Klonierung des TR1- <i>Gene Targeting</i> - Vektors.....	30
2.5.1 Cosmide.....	30
2.5.2 Plasmide .....	31
2.5.3 Desoxy-Oligonukleotide .....	33
2.6 DNA Sonden .....	36
2.7 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus .....	36
2.8 Materialien für die ES-Zellkultur.....	37
2.9 Blastozysten .....	37
2.10 Materialien für die Histologie/ Immunhistochemie.....	38
2.11 Materialien für den CFU assay .....	38
3 Methoden.....	39
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	39
3.1.1 Standard PCR („Polymerase Chain Reaction“) Bedingungen.....	39
3.1.2 Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterien...	40
3.1.3 Präparation plasmidaler und cosmidaler DNA.....	41
3.1.4 Präparation genomischer DNA.....	41
3.1.5 Southern Blot.....	43
3.1.6 Generierung und radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	44
3.1.7 Hybridisierung von DNA-Filtern und Auswertung .....	45
3.2 <i>Gene targeting</i> .....	45
3.2.1. Strategie der Geninaktivierung.....	45
3.2.2 Design des <i>Gene targeting</i> - Konstruktes für konditionale Geninaktivierung durch Verwendung des loxP / Cre-Rekombinase System.....	46
3.3 Methoden der embryonalen Stammzellkultur.....	47
3.3.1 Elektroporation von embryonalen Stammzellen .....	48
3.3.2 Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone .....	48

3.3.3 Auftauen und Expansion der ES-Zellklone.....	49
3.3.4 Blastozysteninjektion und Embryotransfer.....	49
3.4 Zucht der Mauslinien .....	50
3.4.1 Tierhaltung und Hygienestatus .....	50
3.4.2 Etablierung von konditionalen TR-Knock-out-Mausstämmen.....	51
3.4.3 Deletion des von loxP Erkennungsstellen flankierten (floxed) Genabschnitts durch Zucht mit Cre-Rekombinase-transgenen Mäusen .....	52
3.4.4 Genetische Konformität.....	53
3.5 Charakterisierung der TR-Knock-out-Tiere.....	54
3.5.1 Äußere Betrachtung der Embryonen .....	54
3.5.2 Histologische Untersuchung der Embryonen .....	55
3.5.3 Immunhistochemie.....	55
3.5.4 „Colony Forming Units“ („CFU“) Experiment.....	56
4 Ergebnisse .....	58
4.1 TR1 .....	58
4.1.1 Genstruktur der TR1 .....	58
4.1.2 <i>Gene Targeting</i> - Strategie.....	60
4.1.3 Klonierung des <i>Gene Targeting</i> - Vektors pCJ7 .....	62
4.1.4 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen .....	63
4.1.5 Chimärenherstellung und Rückkreuzung der Chimären.....	66
4.1.6 Etablierung von TR1-Knock-out-Mäusen .....	67
4.1.7 Phänotyp der TR1-Knock-out-Embryonen.....	67
4.1.8 Histologische Analyse der TR1-Knock-out-Embryonen.....	74
4.1.9 Zucht und Analyse neuronenspezifischer TR1-Knock-out-Mäuse	82
4.2 TR2 .....	87
4.2.1 Phänotyp der TR2-Knock-out-Embryonen.....	87
4.2.2 Makroskopische Betrachtung der TR2 <sup>del/del</sup> Embryonen.....	87
4.2.3 Histologische Untersuchung der TR2 <sup>del/del</sup> Embryonen.....	88
4.2.4 Hämatopoese bei den TR2-Knock-out-Embryonen .....	92
5 Diskussion.....	96
5.1 TR1 .....	96
5.2 TR2 .....	101
Zusammenfassung.....	106
Summary .....	108
Abkürzungsverzeichnis.....	110
Literaturverzeichnis.....	112
Danksagungen.....	119
Lebenslauf .....	121

## **Meiner Familie**

# 1 Einleitung

## 1.1 Selen

Selen ist ein essentielles Spurenelement. Bereits 1957 konnten Schwarz und Foltz zeigen, dass Ratten, die Selen-depletiertes Futter erhielten, eine nekrotische Leberdegeneration entwickelten (Übersicht in (Schwarz und Foltz 1999)). In der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere ist Selen als Spurenelement gut untersucht. Beispielsweise beträgt der für Geflügelfutter empfohlene Selengehalt 150 µg Selen pro Kilogramm Futter (Heider 1992). Selenmangelzustände können zu Krankheiten wie Muskeldystrophie („Weißmuskelkrankheit“), Leber- und Pankreasnekrosen, Herzmuskeldystrophien, Herzkranzgefäßschädigungen und Störungen in der Spermatogenese führen. Bei Hühnerküken wurde starker Selenmangel (5-20 µg Selen/kg Futter) bei gleichzeitig ausreichender Vitamin E Zufuhr mit Pankreasatrophie und Krankheitssymptomen einer Bauchspeicheldrüseninsuffizienz in Zusammenhang gebracht (Thompson und Scott 1970). Auch beim Menschen sind Selenmangelkrankungen bekannt. Die in Ostasien endemisch vorkommende „Keshan Disease“ manifestiert sich in einer Kardiomyopathie (Burke und Opeskin 2002) und die „Kashin-Beck Disease“ ist durch Osteoarthropathie gekennzeichnet (Sudre und Mathieu 2001).

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. schätzt den Selenbedarf des erwachsenen Menschen auf 30-70 µg Selen/Tag. Die durchschnittliche Aufnahme von Selen in Deutschland beträgt etwa 40 µg Selen pro Tag und wird als suboptimal betrachtet (Oster 1992).

Die biologische Funktion von Selen basiert v.a. darauf, dass es integraler Bestandteil von Proteinen, den sogenannten „Selenoproteinen“ ist (Brown und Arthur 2001). Im Allgemeinen ist die enzymatische Aktivität der Selenoproteine von der Verfügbarkeit von Selen abhängig. Ein erhöhter Selengehalt in der Ernährung führt bei einer Vielzahl von Selenoproteinen, wie z.B. auch bei den Thioredoxinreduktasen zu erhöhten Enzymaktivitäten (Zhong und Holmgren 2000).

Selen in hohen Dosen ist allgemein auch als giftige Substanz bekannt. Weidetiere können sich durch die Aufnahme von bestimmten Pflanzenarten

wie *Astragalus* mit Selen vergiften, da diese Pflanzen hohe Konzentrationen von Selen akkumulieren können (Neuhierl, Thanbichler et al. 1999). Selenvergiftungen können auch iatrogen verursacht oder Folge der Verfütterung von fehlgemischten, mit Selen supplementierten Futtermittelzubereitungen sein. Die Symptome einer Selenvergiftung reichen von Haar-, Huf- und Klauenveränderungen mit knoblauchartigem Atemgeruch bis zu Gewichtsverlust, Ataxien und Erblindung (Übersicht in (Tinggi 2003)). Bei akuter Selenvergiftung kommt es zu Myokardnekrosen, teilweise mit tödlichem Ausgang. Der Mechanismus der Toxizität ist noch nicht genügend geklärt, möglicherweise spielt die chemische Ähnlichkeit von Selen und Schwefel eine ausschlaggebende Rolle. Unspezifisch in Proteine eingebautes Selenocystein kann aufgrund der höheren Reaktivität von -SeH verglichen mit -SH toxische Wirkungen haben (Ganther 1999).

## **1.2 Selenoproteine**

### **1.2.1 Begriffsdefinition**

Proteine, die in ihrer Peptidkette die sogenannte „21. Aminosäure“ Selenocystein („Secys“, „U“) enthalten, werden als Selenoproteine bezeichnet. Bei Säugetieren wird die Anzahl der im Körper vorkommenden Selenoproteine auf etwa 30 bis 50 geschätzt. Diese Anzahl wurde bei Nagetieren durch Verfütterung von <sup>75</sup>Selen und anschließende Proteinauftrennung mittels Western Blot ermittelt, allerdings konnte nur bei etwa einem Drittel der so identifizierten Selenoproteine das dazugehörige Gen und seine biologische Funktion zugeordnet werden (Brown und Arthur 2001). Hinsichtlich ihrer biologischen Funktion werden Selenoproteine häufig in Zusammenhang mit Redoxprozessen gebracht. Eine Übersicht über funktionell untersuchte Selenoproteine ist in Tabelle 1 gegeben (Behne und Kyriakopoulos 2001). Aufgrund ihrer Nukleotidsequenz identifizierte, jedoch funktionell nicht untersuchte Selenoproteine wurden dabei nicht berücksichtigt.

Familie	Enzym	Funktion und Gewebeexpression	Literatur
Glutathion-peroxidasen (GPx)	Zytosolische oder klassische GPx (cGPx, Gpx 1)	Detoxifikation von Wasserstoffperoxid und Alkylhydroperoxiden, ubiquitär exprimiert	(Arthur 2000), (Behne und Kyriakopoulos 2001)
	Gastrointestinale GPx (GI-GPx, GPx 2)	Funktion siehe Gpx 1, in Darmtrakt und Leber exprimiert	(Brigelius-Flohe, Muller et al. 2001), (Wingler und Brigelius-Flohe 1999)
	Plasma GPx (pGPx, GPx 3)	Funktion siehe Gpx1, höchste Konzentrationen in der Niere, die Gpx3 sezerniert	(Yoshimura, Suemizu et al. 1994), (Brigelius-Flohe 1999)
	Phospholipid-Hydroperoxid GPx (PHGPx, GPx 4)	Detoxifikation von (Phospho-) Lipidhydroperoxiden, vielfältige Funktionen in der Spermatogenese	(Ursini, Maiorino et al. 1997)
Thyroxin-Deiodinasen	Typ1 Deiodinase (D1, 5'DI)	Deiodination (Aktivierung) von T4 zu T3, hauptsächlich in Schilddrüse, Leber, Niere und Hypophyse.	(Jakobs, Koehler et al. 1997), (St Germain und Galton 1997)
	Typ 2 Deiodinase (D2, 5'DII)	Lokale Deiodination von T4 zu T3 in Gehirn, braunem Fettgewebe, Hypophyse und Plazenta	(Bartha, Kim et al. 2000), (Kohrle 2002)
	Typ3 Deiodinase (D3, 5'DIII)	Inaktivierung von aktivem T3 zu T2 in ZNS, Plazenta und Haut	(Hernandez, Park et al. 1998), (Kohrle 2000)
Thioredoxin-reduktasen (TR)	Zytosolische TR (TR1)	Intrazelluläres Redoxenzym, ubiquitär exprimiert	(Mustacich und Powis 2000)
	Mitochondriale TR (TR2)	Mitochondriales Redoxenzym, ubiquitär exprimiert	(Gasdaska, Berggren et al. 1999), (Conrad 2001)
	Hodenspezifische TR (TR3)	Thioredoxin-GSH-Reduktase Aktivität, Expression in Hodengewebe	(Sun, Wu et al. 1999)
Selenophosphat-synthetase n (SPS)*	SPS2	Katalysiert die Synthese von Selenophosphat aus Selenit und AMP. Selenophosphat wird zur Synthese von Selenocystein benötigt	(Lescure, Gautheret et al. 1999)



Seleno-protein N*	Sel N	Sel N wird in Zusammenhang mit kongenitaler muskulärer Dystrophie gebracht	(Moghadaszadeh, Petit et al. 2001), (Lescure, Gautheret et al. 1999),
Seleno-protein P*	Sel P	Selentransportprotein, antioxidative Eigenschaften beschrieben, in extrazellulären Flüssigkeiten zu finden	(Mostert 2000; Schomburg, Schweizer et al. 2003),
Seleno-protein R*	Sel R	Methionin-Sulfoxid-Reduktase, reduziert Methioninreste in Proteinen	(Kryukov, Kumar et al. 2002)

\* bislang keiner Familie zugeordnet

### **Tabelle 1: Übersicht über funktionell untersuchte Selenoproteine**

#### 1.2.2 Selenocystein Insertionsmechanismus

1984 erfolgte die Klonierung und Sequenzierung des Gens Formiatdehydrogenase aus *E. coli*. Dabei fiel inmitten des offenen Leserahmens der mRNA ein UGA-Triplett auf, welches bis dahin nur als Stop-Kodon bekannt war. Böck und Kollegen konnten 1991 an diesem Modell zeigen, dass das Nukleotid-Triplett UGA anstelle eines Stop-Kodons auch für die Aminosäure Selenocystein kodieren kann (Forchhammer und Bock 1991). Sie konnten einige der Faktoren („SelA, SelB, SelC, SelD“) identifizieren, die bei Prokaryonten für die kotranslationale Inkorporation von Selenocystein notwendig sind. Berry und Kollegen konnten zeigen, dass dieser konservierte Mechanismus der Selenocystein-Insertion auch in Eukaryonten vorhanden ist (Low und Berry 1996).

Der Selenocystein-Insertionsmechanismus ist ein relativ aufwändiger Prozess, der verglichen mit dem Einbau anderer Aminosäuren sehr ineffizient ist (Suppmann, Persson et al. 1999). Dennoch handelt es sich bei der Inkorporation von Selenocystein um einen von Prokaryonten bis zu Säugetieren reichenden, konservierten Mechanismus. Voraussetzung für die Inkorporation von Selenocystein ist das sogenannte SECIS-Element („Sel D“), eine haarnadelförmige Struktur der RNA, welche bei Prokaryonten direkt hinter dem UGA-Kodon und bei Eukaryonten in der Regel im

3′untranslatierten Bereich der mRNA zu finden ist (Hatfield und Gladyshev 2002). Die weiteren Faktoren, die für die Insertion von Selenocystein notwendig sind, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei Eukaryonten konnte zusätzlich zu den von Böck und Kollegen ursprünglich in Prokaryonten beschriebenen Faktoren SelA, SelB, SelC und SelD (Forchhammer und Bock 1991), noch ein weiterer Faktor identifiziert werden, der mit „SBP2“ bezeichnet wurde (Übersicht in (Lescure, Fagegaltier et al. 2002)).

Faktor	Funktion	Literaturhinweis
„SECIS-Element“ („ <b>S</b> elenocysteine <b>i</b> nsertion <b>s</b> equen- ce element“, „SelD“)	Nukleotidsequenz im 3′untranslatierten Bereich der mRNA, die eine besondere räumliche Sekundärstruktur („Haarnadelform“) ausbildet	(Walczak, Hubert et al. 1997)
„mSelB“/“eEFsec“	Spezifischer Elongationsfaktor (Analogon im Bakterienmodell = SelB), der für die Interaktion des Ribosoms mit der Selenocysteyl-tRNA und dem SBP2 notwendig ist	(Tujebajeva, Copeland et al. 2000)
Selenocystein- spezifische tRNA („Sel C“)	tRNA für Selenocystein mit dem Antikodon ACT	(Bock, Forchhammer et al. 1991)
Selenocystein-tRNA- Synthetase („Sel A“)	Überführung der zunächst mit Serin beladenen Seryl-tRNA in eine Selenocysteyl-tRNA	(Bock, Forchhammer et al. 1991)
SBP2 („ <b>S</b> ECIS <b>b</b> inding <b>p</b> rotein 2“)	Protein mit hoher Bindeaffinität zum SECIS- Element	(Lescure, Allmang et al. 2002)

**Tabelle 2: Faktoren, die für den Selenocystein-Insertionsmechanismus essentiell sind**

Selenocystein unterscheidet sie sich von der Aminosäure Cystein nur durch das Selen- anstelle des Schwefelatoms, wobei das Selenatom bei physiologischem pH leichter ionisierbar und damit reaktiver als das Schwefelatom ist. Es wird vermutet, dass sich der Selenocystein-Insertionsmechanismus evolutionär relativ spät entwickelt hat. Dabei waren möglicherweise die chemischen Charakteristika des Selens ausschlaggebend für die Entwicklung der Selenoproteine, die v.a. aerobe Organismen in sauerstoffreicher Atmosphäre vor oxidativen Stress schützen (Hatfield und Gladyshev 2002).

## 1.3 Thioredoxinreduktasen

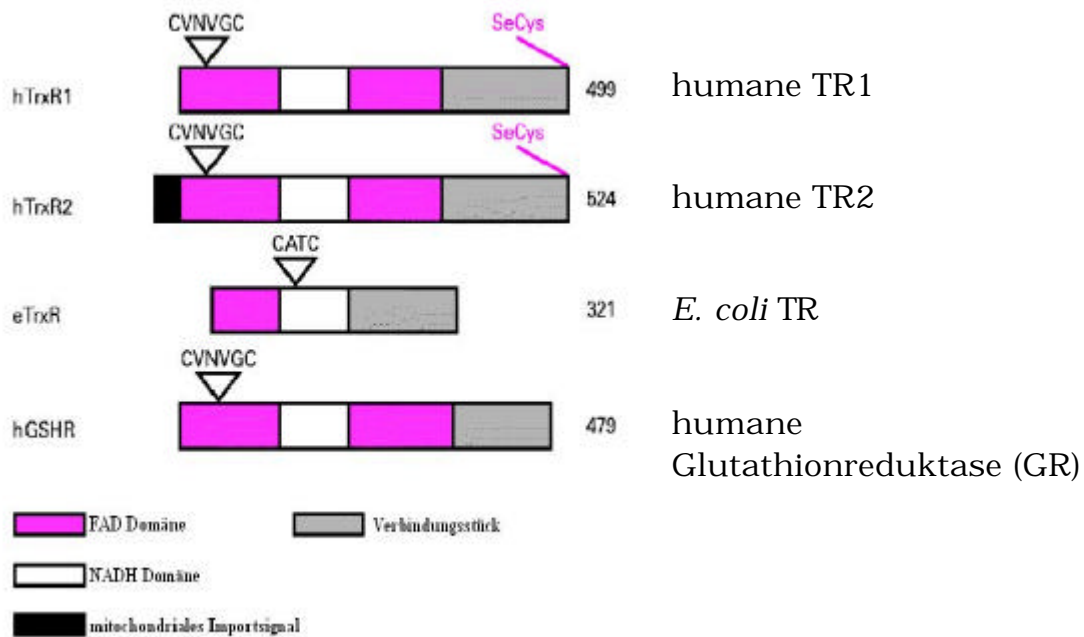
Thioredoxinreduktasen (TR) sind Flavoenzyme, die im gesamten Tierreich konserviert vorkommen. Die TR werden aufgrund ihrer Funktion in die Familie der Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen eingeordnet (Poole, Reynolds et al. 2000). Alle Mitglieder dieser Enzymfamilie besitzen eine NADH- oder NADPH- und eine FADH-Bindedomäne. Bei den Archae- und Eubakterien enthalten die Thioredoxinreduktasen Cystein im redoxaktiven katalytischen Zentrum. Bei Eukaryonten und höheren Lebensformen des Tierreiches hingegen, z.B. dem Nematoden *C. elegans* bis hin zu den Säugetieren, enthalten Thioredoxinreduktasen Selenocystein an zweitletzter Aminosäurenposition.

Die Beschreibung der TR als Bestandteil des Thioredoxin-Thioredoxinreduktase System erfolgte bereits in den frühen 60er Jahren. Dabei wurde sowohl in *E. coli* als auch in Hefen ein redoxaktives Disulfid-Protein identifiziert und als Thioredoxin bezeichnet (Übersicht in (Williams 2000)). Gladyshev und seinen Mitarbeitern gelang es 1996 die humane, zytosolische TR1 als Selenoprotein zu identifizieren (Gladyshev, Jeang et al. 1996), 1999 wurde eine zweite humane Thioredoxinreduktase als mitochondriales Selenoprotein (TR2) beschrieben (Gasdaska, Berggren et al. 1999).

### 1.3.1 Struktur der Thioredoxinreduktasen

In Säugetieren gibt es drei verschiedene Thioredoxinreduktasen („TRn“), die zytoplasmatische, die mitochondriale und die im Hoden exprimierte TR, die jeweils von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Alle drei enthalten Selenocystein als vorletzte Aminosäure, die zugleich Bestandteil des dort befindlichen, C-terminalen, redoxaktiven katalytischen Zentrums ist. Den TRn ist gemein, dass sie sich aus zwei identischen Monomeren zusammensetzen und somit Homodimere bilden. Jedes Monomer enthält dabei neben der FADH- und NAD(P)H-Bindedomäne ein N-terminales, konserviertes, redoxaktives Zentrum (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys), das dem der Glutathionreduktasen sehr ähnlich ist (vgl. Abbildung 1). Darüber hinaus besitzen sie zusätzlich ein C-terminales redoxaktives Zentrum (-Cys-

SeCys-) und ein Verbindungsstück zwischen dem C-terminalen Redoxzentrum und der FADH-Bindedomäne. Die TR2 besitzt zusätzlich am N-Terminus ein mitochondriales Importsignal. Der Vergleich der Proteinstrukturen der humanen TR1, TR2, Glutathionreduktase und der bakteriellen TR sind in Abbildung 1 mit Angabe der Aminosäureanzahl schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Vergleich der TR-Isoformen und Glutathionreduktase** (Mustacich und Powis 2000)

Der Locus der TR1 befindet sich beim Menschen auf Chromosom 12q23-q24.1 und bei der Maus auf Chromosom 10. Die TR2 ist beim Menschen auf Chromosom 22q11.2 bzw. auf Chromosom 16 bei der Maus zu finden. Die TR3 liegt beim Menschen auf Chromosom 3p13-q13.33 bzw. auf Chromosom 6 bei der Maus.

Die Proteinsequenzen der murinen TR1 und TR2 sind zu 72% homolog. Die Nukleotidsequenzen der murinen TR1 und TR2 sind zu 54% identisch. Die Sequenz der TR2 unterscheidet sich dabei v.a. durch die N-terminal lokalisierte, mitochondriale Erkennungssequenz. Die Nukleotidsequenzen der murinen TR1 und TR3 sind zu 72% identisch. In Tabelle 3 sind weitere Daten zu den Thioredoxinreduktasen der Maus zusammengefasst.

	Chromo- som	cDNA- Länge	Anzahl Amino- säuren	kalkulierte Proteinmasse	NCBI Datenbank ID-Nummer
TR1	10	3226 Bp	499	54,5 kDa	GI:12658436
TR2	16	1883 Bp	527	56,8 kDa	GI:5764538
TR3	6	2656 Bp	615	67,5 kDa	GI:13569628

**Tabelle 3: Daten zu den Thioredoxinreduktasen bei der Maus (*mus musculus*)**

#### 1.3.2 Expression der Thioredoxinreduktasen

Die TR1 und TR2 sind ubiquitär exprimiert, d.h. sie wurden zumindest in Form von RNA in Northern Blots oder als ESTs („Expressed Sequence Tags“) nachgewiesen. Die EST-Informationen können auf der Homepage des „National Center for Biotechnology Information“, Bethesda, USA abgefragt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). Die Expression der TR3 wurde bisher nur im Hodengewebe nachgewiesen. Die subzelluläre Lokalisation der TR1 ist im Zytoplasma, wohingegen die TR2 hauptsächlich in Mitochondrien vorkommt. In Tabelle 4 sind Northern Blot Resultate zur RNA-Expression der TR1 und der TR2 aus verschiedenen Publikationen zusammengefasst. Dabei wurde je nach Stärke des Hybridisierungssignals auf den Northern Blots eine grobe Einteilung der RNA-Expression in hoch (+++), mittel (++) und gering (+) vorgenommen.

	Gehirn	Thymus	Lunge	Milz	Leber	Prostata	Nieren	Colon-mucosa	Hoden	Herz	Uterus	Dünndarm	Skelettmuskel	Leukozyten	Plazenta
TR1 hs (Gasdas ka, Berggre n et al. 1999)	++ +	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++ +	+++ +	+++ +	+++	+++ +	+	+++ +
TR1 hs u.	n.	+++	n.u	++	n.u	+++	n.u	++	+++ +	n.u	+++ +	+++	n.u	+	
TR1 mm (Kawai, Ota et al. 2000)	+	+++	+++	+	+++ +	n.u	+++ +	+++	+++	+	n.u	n.u	n.u	n.u	
TR1 mm (Sun, Wu et al. 1999)	++	n.u	+	+	+++ +	n.u	+++	n.u	+	+++	n.u	n.u	+	n.u	
TR1 rn (Rundlo f, Carlsten et al. 2000)	++	n.u	+++	+	+++ +	n.u	+++ +	n.u	++	+++	n.u	n.u	++	n.u	
TR2 mm (Mirand a- Vizuite, Damdi mopoul os et al. 1999)	++	n.u	+	+++	+++ +	n.u	+++	n.u	+	+++ +	n.u	n.u	+	n.u	
TR2 mm	+	++	+++	++	+++ +	n.u	+++ +	++	+++	+++	n.u	n.u	n.u	n.u	
TR2 mm	+	n.u	+	++	+++	n.u	++	n.u	+	+++ +	n.u	n.u	+	n.u	

**Tabelle 4: Northern Blot Resultate**

(hs: homo sapiens, mm: Mus musculus, rn: Rattus norvegicus , n.u.: nicht untersucht

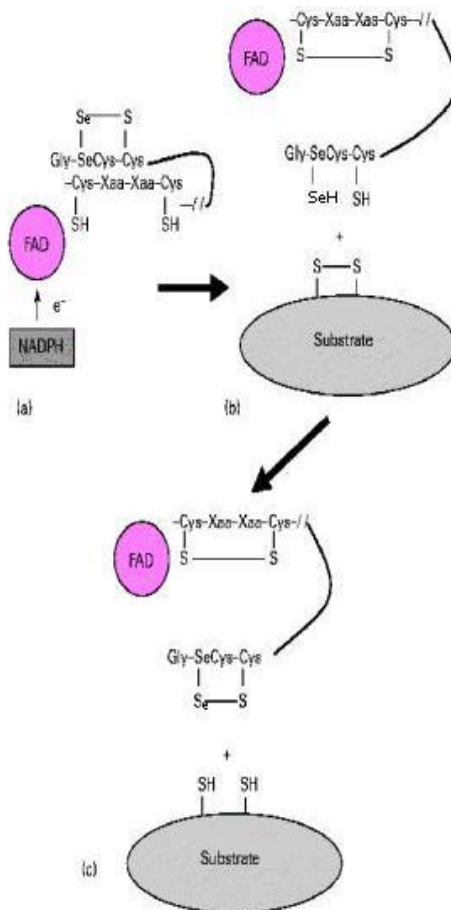
### 1.3.3 Das Redoxenzym Thioredoxinreduktase

Organismen müssen fortwährend ihren Redoxstatus aufrechterhalten. Der Redoxstatus der Zelle ist v.a. für den Phosphorylierungsgrad und den Thiol-Status von Proteinen von großer Bedeutung. Der Redoxstatus der Proteine wiederum beeinflusst verschiedenste Zellaktivitäten, z.B. Ligand-Rezeptor Interaktionen, nukleäre Translokationsprozesse oder DNA-Bindungsaktivitäten von Transkriptionsfaktoren (Schafer und Buettner 2001). An der Aufrechterhaltung des Redoxstatus einer Zelle sind im wesentlichen das Thioredoxin-System (Trx/TR, siehe Kapitel 1.3.4), das Glutathionsystem (GSSG/2GSH) und das NADP<sup>+</sup>/NADPH-System beteiligt (Schafer und Buettner 2001).

#### **1.3.3.1 Enzymatische Aktivität der Thioredoxinreduktasen**

Die TRn besitzen jeweils zwei Redoxzentren. Das N-terminale, phylogenetisch gut konservierte Redoxzentrum befindet sich innerhalb der FADH-Bindedomäne und besteht aus den Aminosäuren Cystein-Valin-Asparagin-Valin-Glycin-Cystein. Dieses N-terminale Redoxzentrum, das auch in anderen Enzymen, wie der Glutathionreduktase oder der Lipoamiddehydrogenase zu finden ist, kann reversibel Disulfidbrücken bzw. Sulfhydrylreste ausbilden. Dabei liefert NADPH zuerst Elektronen an das enzymgebundene FAD, welches wiederum das redoxaktive Disulfid zu den entsprechenden Thiolen reduziert (vgl. Abbildung 2). Anschließend werden die Elektronen vom N-terminalen Redoxzentrum auf das C-terminale Redoxzentrum, bestehend aus den Aminosäuren Glycin-Cystein-Selenocystein-Glycin, übertragen.





**Abbildung 2: Elektronentransfer innerhalb der TR (Mustacich und Powis 2000)**

Das Selenocystein enthaltende, C-terminale Redoxzentrum der TR1 liegt im reduzierten Zustand als Selenolthiol (SeH-SH) und im oxidierten Zustand als Selenenylsulfid (-Se-S-) vor. Selenenylsulfidbrücken besitzen eine höhere Reaktivität als Disulfide (Ganther 1999). Das Selenocystein im Redoxzentrum scheint dabei für die enzymatische Aktivität der TR1 essentiell zu sein, da durch selektive Alkylierung des Selenocysteins eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität der TR1 *in vitro* gezeigt werden konnte (Gorlatov und Stadtman 1998).

Neben dem wohl wichtigsten Substrat, dem Thioredoxin (Trx), vermag die TR1 verschiedene andere Substrate zu reduzieren. Beispielsweise ist die TR1 durch die Reduktion von Dehydroascorbat am Vitamin-C Metabolismus beteiligt. Darüber hinaus vermag sie Ubiquinon (Xia, Nordman et al. 2002), welches nicht nur in Mitochondrien als Bestandteil der Atmungskette, sondern auch in Membranen diverser Zellkompartimente als aktives

Redoxlipid nachgewiesen werden konnte (Crane 2001), zu reduzieren. Außerdem ist die TR1 bei der Synthese von L-Dopa als Vorstufe zu Dopamin durch Reduktion von Biopterin zu Dihydropterin, welches wiederum als Kofaktor von der Tyrosinhydroxylase benötigt wird, indirekt involviert (Schallreuter, Buttner et al. 1994). Weitere Substrate, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Lipidhydroperoxide, die von TRn reduziert werden können, werden bereits diskutiert (Nordberg und Arner 2001).

#### **1.3.3.2 TR1 und Apoptose**

Kalvakolanu et al. konnten durch *in vitro* Studien mit diversen humanen Tumorzelllinien zeigen, dass die gleichzeitige Applikation von IFN- $\beta$  und Vitamin-A Derivaten in Tumorzellen Apoptose auslöst (Ma, Karra et al. 2001). Bei der Suche nach Genen, die für diesen Mechanismus verantwortlich sein könnten, wurde die humane TR1 identifiziert (Hu, Ma et al. 2001). Die Beteiligung der TR1 an apoptotischen Prozessen konnte dadurch erklärt werden, dass die TR1 zusammen mit Trx1 die Aktivitäten von Caspase 8 und p53 modulieren und damit Zelltod auslösen kann. Um den zugrunde liegenden Mechanismus der IFN- $\beta$  /Vit A induzierten Apoptose zu studieren, wurden Mutanten der TR1 hergestellt und in Tumorzelllinien überexprimiert. Die Mutationen beschränkten sich hauptsächlich auf den Bereich des Verbindungsstücks („*Interface domain*“, vgl. Abbildung 1). Dabei stellte sich heraus, dass das Fehlen der „*Interface domain*“ eine langsamere Proliferation bei gleichzeitigem Anstieg der Apoptoserate von Tumorzellen induziert. Zusätzlich konnte eine kleine Region innerhalb der „*Interface Domain*“ identifiziert werden, die regulatorischen Einfluss auf p53 assoziierte Genexpression haben könnte (Ma, Hu et al. 2002). Damit konnte gezeigt werden, dass die TR1 bei apoptotischen Prozessen intrazelluläre Signaltransduktionsvorgänge in Tumorzellen beeinflussen kann.

#### 1.3.4 Thioredoxin

Das eigentliche Substrat der TRn sind die Thioredoxine („Trx“). Bei den Säugetieren sind bisher zwei Gene für Trx kloniert worden. Die Gene für Trx1 und Trx2 befinden sich beim Menschen auf den Chromosomen 9q31 bzw. 22q13.1. Die subzelluläre Lokalisation von Trx1 ist hauptsächlich im Zytoplasma, es wurde allerdings auch schon im Zellkern nachgewiesen. Da Trx1 kein eigenes nukleäres Lokalisierungssignal besitzt, kann es nur in den Kern translozieren, wenn es z.B. an den aktivierten Transkriptionsfaktor NFκB gebunden ist (Hirota, Murata et al. 1999). Trx2 besitzt ein mitochondriales Importsignal und in den Mitochondrien lokalisiert. Somit gibt es zwei subzellulär unterschiedlich lokalisierte TR/Trx-Systeme, wobei noch nicht bekannt ist, ob diese beiden Systeme gegenseitig ausgetauscht werden können.

Trx ist ein wichtiges Thiol-Redoxsystem ( $\text{TrxSS}/\text{Trx}(\text{SH})_2$ ) der Zelle, das in Konzentrationen von 1-10  $\mu\text{M}$  in der Zelle vorkommt. Damit ist die Konzentration von Thioredoxin 100- bis 1000-fach geringer als die des Glutathions. Reduziertes Trx dient in der Zelle als Elektronendonator (siehe 1.3.4.1). Oxidiertes Trx wird von Thioredoxinreduktasen in die reduzierte Form zurückgeführt, wobei die dafür erforderliche Elektronen von NADPH bereitgestellt werden. Das NADPH/NADP<sup>+</sup> Verhältnis im Zytoplasma der Zelle beträgt etwa 100/1 (Schafer und Buettner 2001).

##### 1.3.4.1 Thioredoxin 1

Thioredoxin 1(Trx1) ist ein Redoxprotein, das ursprünglich in *E. coli* als Kofaktor der Ribonukleotidreduktase identifiziert wurde. Neben der Involvierung von Trx in DNA-Metabolismus sind inzwischen eine Vielzahl weiterer, zellulärer Prozesse bekannt, an denen Trx beteiligt ist (Arner und Holmgren 2000). Trx besitzt ein redoxaktives Zentrum, das dem N-terminalen Redoxzentrum der TRn ähnlich ist und an dem reversibel Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Im Nachfolgenden sollen einige Beispiele aufgeführt werden, anhand derer die Funktionen des Trx erläutert werden sollen.

Trx ist in Signaltransduktionsprozesse involviert, z.B. indem es den Oxidationsstatus von kritischen Cystein-Resten in verschiedenen Transkriptionsfaktoren, z.B. NF $\kappa$ B und Ref-1, moduliert, und dadurch deren DNA-Bindungsaffinität beeinflussen kann. Trx kann von verschiedenen Zellen sezerniert werden und dient somit als extrazellulärer Immunmodulator bzw. Zytokin bei Entzündungsvorgängen (Nishinaka, Nakamura et al. 2002). Trx hat chemokine Eigenschaften, da es im Plasma zirkuliert und die chemotaktische Bewegungsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten beeinflussen kann (Nakamura, Herzenberg et al. 2001).

Bei AIDS-Patienten konnte ein chronisch erhöhter Plasmaspiegel von Trx gemessen werden, der möglicherweise negative Auswirkungen auf das Immunsystem haben könnte. Darüber hinaus wird die intravenöse Applikation von Trx zur Verhinderung von Reperfusionsschäden nach Ischämie diskutiert (Aota, Matsuda et al. 1996). Weiterhin ist Trx Kofaktor einer Reihe von Enzymen, wie der Methionin-Sulfoxidreduktase (Moskovitz, Weissbach et al. 1996). Die Methionin-Sulfoxidreduktase dient der Reduktion von oxidierten Methioninresten in Proteinen, die z.B. als Folge von Inflammationsvorgängen entstehen. Der reduzierte Zustand der Methioninreste ist bei einer Vielzahl von Proteinen essentiell für den Erhalt ihrer biologischen Aktivität. Nicht zuletzt ist Trx Kofaktor von Peroxiredoxinen (Rhee, Kang et al. 2001), einer Familie von intrazellulären Proteinen, die nach dem bisherigen Erkenntnisstand verschiedenste Peroxide, die im Zellstoffwechsel laufend entstehen, reduzieren und damit detoxifizieren können. Bisher wurden beim Menschen sechs verschiedene Peroxiredoxine identifiziert, die in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten vorgefunden werden (Hofmann, Hecht et al. 2002).

#### **1.3.4.2 Thioredoxin 2**

In den Mitochondrien entstehen als Nebenprodukte der Zellatmung laufend Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species, „ROS“). Um durch diese Radikale nicht geschädigt zu werden, haben Zellen eine Vielzahl von antioxidativen Systemen entwickelt. Neben der PHGPx existiert in Mitochondrien ein zweites Selen-abhängiges Antioxidationsystem,

bestehend aus TR2, Trx2 und Peroxiredoxin III (Tanaka, Hosoi et al. 2002). Peroxiredoxin III wurde als ein von c-Myc reguliertes Gen identifiziert und scheint bei proliferierenden Zellen für eine intakte Mitochondrienfunktion wichtig zu sein (Wonsey, Zeller et al. 2002). TR2 reduziert oxidiertes Trx2, welches wiederum Peroxiredoxin III reduzieren kann.

Tanaka und Kollegen untersuchten die Bedeutung des Trx2 durch funktionellen Knock-out des Trx2 Gens in Hühner-B-Lymphozyten. Sie konnten zeigen, dass Trx2-defiziente B-Lymphozyten langsamer proliferieren und gleichzeitig schneller in Apoptose gehen, da sie das mitochondriale Membranpotential nicht aufrecht erhalten können (Tanaka, Hosoi et al. 2002). Trx2-Knock-out-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben etwa am Tag 11 der Embryonalentwicklung (Nonn, Williams et al. 2003).

#### 1.3.5 TR1 und Tumor

Die Analyse von verschiedensten Tumorgeweben ergab, dass die TR-Expression bzw. TR-Aktivitäten häufig erhöht waren, z.B. konnten in neoplastischem Lebergewebe der Ratte erhöhte Thioredoxinreduktaseaktivitäten festgestellt werden (Bjorkhem, Teclebrhan et al. 2001). Bei der Suche nach diagnostischen Markern für Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde das Expressionsprofil von 5289 Genen zwischen Pankreastumorzelllinien und gesundem Pankreasgewebe verglichen. Dabei stellte sich ebenfalls heraus, dass die TR1 neben 30 weiteren Genen deutlich überexprimiert war (Han, Bearss et al. 2002). Bei der Pathogenese bestimmter gastrointestinaler Tumoren wurde Gallensäure als potentiell kanzerogene Substanz vermutet. Daher wurden Colontumorzelllinien experimentell mit Gallensäure versetzt und die damit ausgelöste Veränderung des Genexpressionsprofils der Zelllinien analysiert. Auch in dieser Studie konnte eine signifikante Erhöhung der TR1 festgestellt werden (Lechner, Muller-Ladner et al. 2002). Schuhmacher und Kollegen konnten zeigen, dass die TR1 ein von c-Myc induziertes Gen ist (Schuhmacher, Kohlhuber et al. 2001). c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Proliferation von gesunden Zellen essentiell,

allerdings häufig in Tumorzellen dysreguliert und dabei verstärkt überexprimiert ist (Oster, Ho et al. 2002).

Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung der Zusammenhänge der TR1-Funktion in Tumorzellen war die Beobachtung von Ma und Kollegen, die die TR1 als Gen identifizierten, das ursächlich an der durch Interferon (IFN)/Vitamin A ausgelösten Apoptose von Tumorzellen beteiligt sein könnte (Ma, Karra et al. 2001). *In vivo* Studien an mit Tumorzellen transplantierten Mäusen bestätigten die Bedeutung der TR1 an der durch IFN/Vitamin A-Gabe induzierten Hemmung des Tumorwachstums (Lindner, Ma et al. 2002). Darüber hinaus wurden erst kürzlich mögliche funktionelle Zusammenhänge zwischen dem Selenoprotein TR1 und dem Tumorsuppressorgen p53 beschrieben. Moos und Kollegen zeigten, dass elektrophile Prostaglandine und Lipidaldehyde, die sich als kanzerogen erwiesen hatten, mit der Akkumulation von funktionsunfähigem p53 in Zellen in Zusammenhang stehen. Elektrophile Prostaglandine und Lipidaldehyde können kovalente Bindungen mit TR1 eingehen und damit die Aktivität der TR1 blockieren. Aktives TR1 ist jedoch für die Überführung von p53 in seine biologisch aktive Form notwendig. Eine erhöhte Aktivität der TR1 könnte in diesem Fall indirekt durch den Erhalt von biologisch aktivem p53 antikanzerogene Effekte haben (Moos, Edes et al. 2002).

Möglicherweise hat Selen als Spurenelement in der Nahrung ebenfalls antikanzerogene Potenz. In einer Ernährungsstudie mit freiwilligen Probanden zeigte sich, dass die gezielte Supplementierung der Nahrung mit Selen das Risiko einer Tumorerkrankung reduzieren kann ((Clark, Combs et al. 1996) und (Combs, Clark et al. 1997)). Der Mechanismus dieser antikanzerogenen Wirkung des Selens ist allerdings ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen (Kim und Milner 2001). Möglicherweise spielt die TR1 als Selenoprotein hierbei eine Rolle. Bei *in vitro* Untersuchungen zur Problematik der Chemotherapeutik-Resistenz in Tumorzellen wurde unlängst die enzymatische Aktivität TR1 bei gezielter Selenzufuhr untersucht (Bjorkhem-Bergman, Jonsson et al. 2002). Zytostatika-resistente Lungenkarzinomzellen wiesen zunächst höhere Basisaktivitäten der TR1 als Zytostatika-sensible Lungenkarzinomzellen auf. Resistente Zellen konnten allerdings im Gegensatz zu den Zytostatika-sensiblen Karzinomzellen bei der

Zufuhr von Selen zum Zellkulturmedium nicht mit einer weiteren Erhöhung der TR1-Aktivität antworten, stattdessen zeigten sie Anzeichen einer Selenintoxikation. Dies lässt einerseits die Schlussfolgerung zu, dass bei Zytostatika-resistenten Karzinomzellen die Regulationsmechanismen der TR1-Aktivität gestört ist und dass Selen in noch regulationsfähigen Zellen durch Erhöhung der TR1-Aktivität antikanzerogene Effekte haben könnte. Andererseits besteht möglicherweise eine antikanzerogene Wirkung von Selen darin, dass es auf solche Tumorzellen zytotoxisch wirkt, deren TR1-Aktivität erhöht und TR1-Regulation gestört ist.

## **1.4 Die Laboratoriumsmaus als Tiermodell**

### **1.4.1 Gezielt genetisch veränderte Mauslinien**

Zur Untersuchung der Funktion der Thioredoxinreduktasen im Säugetierorganismus wurde die Maus (*Mus musculus*) als Modelltier gewählt. Allgemein setzt der Umgang mit Laboratoriumstieren eine gründliche Prüfung der wissenschaftlichen Fragestellung voraus. Die Funktion des zu erforschenden Gens im Gesamtorganismus kann durch verschiedenen Methoden untersucht werden. Ein klassischer Weg, der zum Verständnis von Genfunktionen beiträgt, ist die Beschreibung von familiären Erbkrankheiten. Zunächst werden Anamnese und klinische Symptome der erkrankten Familienmitglieder dokumentiert und anschließend möglichst viele, auch nicht erkrankte Familienmitglieder genetisch untersucht, z.B. durch Überprüfung auf Euploidie, Chromosomenabnormalitäten und Genmutationen.

Bei der Verwendung gezielt genetisch veränderter Organismen beschreitet man den umgekehrten Weg. Die gezielte Mutation bzw. Ausschaltung eines Gens ist hier der Ausgangspunkt der Untersuchungen. Man kann zunächst molekularbiologische bzw. biochemische Daten über die Struktur, Expressions- und Proteineigenschaften eines Gens sammeln. Dann können *in vitro* Studien auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. Letztlich aber ist es sinnvoll, die Funktion eines Gens im Gesamtorganismus zu kennen.

Eigentlich ist die Methode der Überexpression eines Gens *in vitro* oder *in vivo* (transgene Mäuse) die gängigste molekularbiologische Methode zur Untersuchung von Genfunktionen. Allerdings erschien diese Methode zur Untersuchung von Selenoproteinen ungeeignet, da der sehr ineffiziente Prozess der Selenocystein-Insertion eine Überexpression von Selenoproteinen zumindest *in vivo* erschwert. Daher wurde das Knock-out-Mausmodell, d.h. eine Mauslinie, bei der ein einzelnes Gen gezielt inaktiviert wird, gewählt, um durch einen charakteristischen Phänotyp Aufschluß über *in vivo*-Genfunktionen zu gewinnen. Ein entscheidender Vorteil des Knock-out-Mausmodells besteht darin, dass Tiere miteinander verglichen werden können, die sich nur durch das Fehlen bzw. Vorhandensein eines Gens unterscheiden. Die genetische Variabilität der Vergleichstiere minimiert man durch Verwendung von Inzuchtmausstämmen und umweltbedingte Einflussfaktoren durch den Vergleich von Wurfgeschwistern, die unter denselben Verhältnissen aufgewachsen sind. Neuerliche wissenschaftliche Erkenntnisse über genetisch veränderte Mausmodelle nehmen rapide zu (siehe <http://tbase.jax.org/>, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, oder <http://www.bioscience.org/Knock-out/knohome.htm>, Frontiers in Bioscience, Albertson, NY, USA), so dass Vergleiche ähnlicher Phänotypen weiter zum Verständnis von Genfunktionen im Gesamtorganismus beitragen werden. Das Knock-out-Mausmodell eignet sich aber auch zur Untersuchung von Genfunktionen in einzelnen Organen, sofern es sich um „konditionale“ Knock-out-Mauslinien handelt. Bei der Herstellung von konditionalen Knock-out-Maus-Modellen bedient man sich in der Regel des loxP/Cre-Rekombinase-Systems. Dieses ermöglicht die Ausschaltung eines Gens nur in bestimmten Organen oder zu bestimmten Zeitpunkten.

Zur rechtlichen Situation beim Umgang mit genetisch veränderten Mausmodellen soll hier erwähnt werden, dass es sich nach dem Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105), zuletzt geändert durch Artikel 11 § 1 des Gesetzes zur Neuorganisation des gesundheitlichen Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit vom 6. August 2002 (BGBl. I S. 3082) und der entsprechenden Auslegung der zuständigen Genehmigungsbehörde



(Regierung von Oberbayern) bei der Etablierung von Knock-out-Mausstämmen nicht um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch handelt. Gleichwohl müssen die in diesem Zusammenhang zu wissenschaftlichen Zwecken getöteten Tiere nach der Verordnung über die Meldung von Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere (Versuchstiermeldeverordnung) vom 04.11.1999 gemeldet werden.







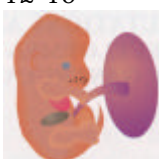
#### 1.4.2 Reproduktionsphysiologie und pränatale Letalität der Maus

Im Nachfolgenden sollen nun kurz einige physiologische Daten zur Reproduktionsbiologie und Embryonalentwicklung der Maus beschrieben werden, als Basisverständnis für die Zucht von Knock-out-Mauslinien. Die Gestationszeit der Maus beträgt je nach Stamm etwa 19-21 Tage. Zur Feststellung des genauen Stadiums der Embryonalentwicklung bei der Maus ist die sogenannte „Plugkontrolle“ üblich. Dabei wird nach Verpaarung der Tiere jeweils morgens das weibliche Tier auf einen Vaginalpfropf untersucht. Dieser besteht aus dem Sekret der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Findet man einen Vaginalpfropf vor, wird dieser Tag als Tag E0,5 der Embryonalentwicklung definiert, da man davon ausgeht, dass die Kopulation meistens nachts erfolgt und am Morgen danach die Embryonalentwicklung bereits etwa 12 h fortgeschritten ist.

Im Falle von genetisch veränderten Mausstämmen werden innerhalb eines Wurfes sowohl genetisch veränderte als auch genetisch unveränderte, sogenannte „Wildtyp“ Geschwister geboren - vorausgesetzt die genetische Veränderung ist mit dem Leben vereinbar. Genetische Veränderungen können aber auch zur Letalität eines Embryos führen, was je nach Entwicklungsstadium zu Resorption oder Mumifikation im Uterus führt. Embryonaler Tod und Resorptionen *in utero* sind aber auch natürlich vorkommende Ereignisse. Bei der Maus variiert die natürliche Resorptionsrate abhängig vom Stamm und Tierhaltungsbedingungen zwischen 5% und 20% der Wurfgeschwister (Übersicht in (Ward 2000)). Copp et al. postulierten 1995 (Übersicht in (Ward 2000)), dass die embryonale

Entwicklung ab dem Tag E12 der Gestationszeit bis zur Geburt im Grunde genommen von drei Organsystemen abhängig ist: Plazenta, Herz-Kreislauf-System und Leber.

Einige wichtige Stadien der Embryonalentwicklung der Maus sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tag der Entwicklung	Stadium	Vorgänge	mögliche Ursachen der Letalität	besonders wichtige Aspekte
0,5 	Einzellstadium	Befruchtung der Eizelle	variabel	
1,5 	Zweizellstadium	Proliferation	variabel	Beginn der Transkription des Genoms der Zygote
2,5 	Morula	Proliferation	variabel	
3,5 	Blastozyste	Einnisten in den Uterus (Tag 4-5)	variabel	
6-9 	Keimblatt-Entwicklung (Gastrulation)	Differenzierung in Endoderm, Ektoderm und Mesoderm	variabel	rapide Zunahme der Zellzahl, Differenzierung in verschiedene Zelllinien
9-12 	Organ-Entwicklung (Organogenese)	Entstehung der primären Körperachse im Embryo, Anlage der Organsysteme: Plazenta, Herz-Kreislauf-System, Leber, hämatopoetisches System etc.	variabel	Zunahme der Embryogröße und damit einhergehende Zunahme an Nährstoff- und Sauerstoffbedarf
12-19 	Fetal-Entwicklung	Wachstum und Differenzierung der Organe	Herz-Kreislauf-System, Plazenta, Leber	

**Tabelle 5: Vereinfachte Übersicht zur Embryonalentwicklung der Maus**

In der Embryonalentwicklung der Maus kommt es ab dem Tag E7.5 zu starker Volumenvergrößerung des Embryos. Der bis dahin ausschließlich per Diffusion ernährte Embryo beginnt einen eigenen Kreislaufapparat zu entwickeln. Es entsteht zunächst ein frühes Zirkulationssystem im Dottersack (von embryonalem Mesoderm abstammend), bestehend aus blutbildenden Zellinseln und endothelialen Zellen. Über dieses Dottersackgefäßsystem wird der im Inneren des Dottersacks befindliche Embryo allerdings immer noch per Diffusion ernährt. Parallel mit den Dottersackgefäßen entwickeln sich etwa ab dem Tag E8.0 erste embryonale Gefäße und ein primitives Herz. Ungefähr ab Tag E9.5 übernehmen diese die Ernährung des Embryos anstelle des Dottersackgefäßsystems. Die starke Vaskularisierung des Embryos mündet schließlich in einen vollständig ausgebildeten embryonalen Kreislaufapparat, der über Chorion und Allantois mit dem maternalen Kreislauf Verbindung aufnimmt. Diese Verbindung sorgt nunmehr für die Ernährung des Embryos. Bis zur Geburt bleibt der Embryo über die embryonale Aorta, Umbilicalgefäße und Nabelschnur mit der Plazenta verbunden.

## **1.5 Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit knüpft direkt an vorhergehende Arbeiten von Marcus Conrad am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF München, an (Conrad 2001). Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit Redoxprozessen, oxidativem Stress und seinem Einfluss auf die Apoptose-Regulation *in vivo*. Vor allem sollen die Funktionen von Selenoproteinen in intrazellulären, apoptotischen Vorgängen untersucht werden. Mitochondrien spielen dabei eine herausragende Rolle, daher wurde die TR2 als mitochondriales Selenoprotein in Mäusen inaktiviert. Da die beiden ubiquitär exprimierten TRn aufgrund ihrer hohen Homologie möglicherweise einander funktionell ersetzen können, sollte in dieser Arbeit zusätzlich die Funktion der TR1 mittels Gen-Knock-out in der Maus untersucht werden. Vergleichend dazu sollte die Phänotypisierung der zuvor von M. Conrad etablierten TR2-defizienten Mauslinie erfolgen (Conrad 2001).

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-gal)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Agarose	ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA
Ampicillin	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Desoxynukleotidtriphosphate	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
DNA-Größenstandard	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
ESGRO™ ("Murine Leukemia Inhibitory Factor", "LIF")	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gancyclovir	Syntex Hamilton Pharma, Inc., USA
Kanamycin	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
LMP Agarose	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
$\beta$ -Mercaptoethanol	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Neomycin (G418)	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ )	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Phenol	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Sephadex-G50, DNA grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Trypsin/EDTA	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
--------------	---

Alle in der Arbeit genannten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

## 2.2 Radioaktive Isotope

[ <sup>32</sup> P]-CTP (3000 mCi/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
---	---

## 2.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Klenow-Enzym	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendo-nukleasen	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Taq Polymerase	Invitrogen GmbH, Berlin
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

## 2.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

Material	Bezugsquelle
3MM-Papier	Whatman Limited, Maidstone, Kentucky, USA
Advantage <sup>®</sup> PCR Enzyme System	Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
DNA Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNA Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNEasy <sup>™</sup> Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden

---

Elektroporationsküvetten, 4 mm	Bio-Rad Laboratories, München
Hybond-N+ Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

---

## **2.5 Materialien für die Klonierung des TR1-Gene Targeting - Vektors**

### 2.5.1 Cosmide

Die DNA-Filter wurden vom RZPD Berlin (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) im Rahmen des „Human Genome“ Projektes, an dem auch einige Institute der GSF beteiligt sind, zur Verfügung gestellt. Es wurden DNA-Filter verwendet, die als genomische Bank mit der Bezeichnung „Library 121“ geführt werden. Die für die Cosmid-Bank verwendete Maus-DNA stammt aus Milzgewebe einer 129/Ola Maus. Für die Herstellung der Cosmid-Bank wurde die isolierte DNA in Fragmente von etwa 35-45 kBp gespalten und in den Cosmidvektor Lawrist 7 (RZPD) kloniert. Die auf insgesamt 11 DNA-Filter mit den entsprechenden Koordinaten aufgetragene Cosmid-Bank deckt das gesamte Mausgenom statistisch gesehen fünffach ab. Zu jedem Cosmid, das jeweils ein etwa 35-45 kBp großes genomisches Maus-DNA Fragment enthält, kann der entsprechende Bakterienklon angefordert werden. Durch Hybridisierung der DNA-Filter mit einer für das gewünschte Gen spezifischen Sonde können die Koordinaten der positiven Klone identifiziert und die zugehörigen Bakterienkulturen angefordert werden.

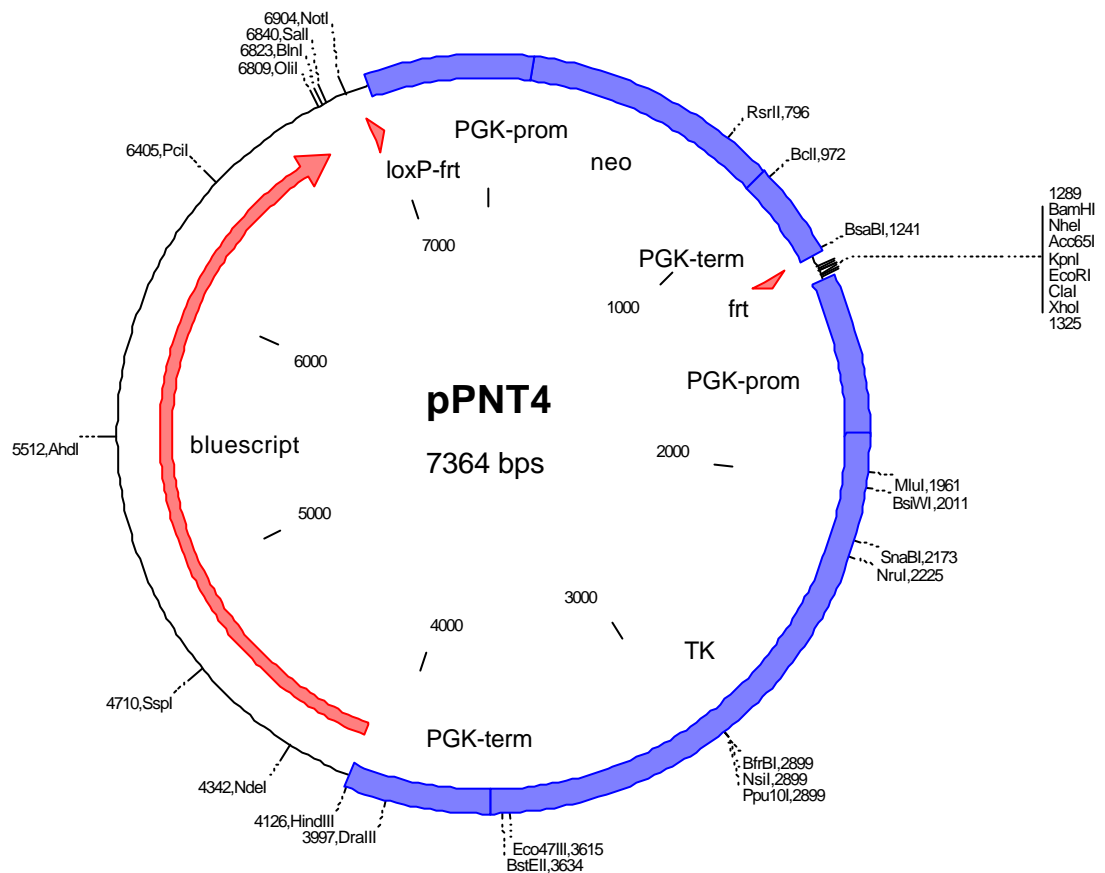
## 2.5.2 Plasmide

### 2.5.2.1 Zur Verfügung gestellte Plasmide

Name	Größe (Bp)	Ausgangs- vektor/ Bezug	Insert
pBluescript SK+	2958	Stratagene	kleines Phagemid mit hoher Kopienzahl
pCAGGSflpe	7706	F. Stewart	enthält eine Flp-IRES-Puromycin Expressionskassette
pPNT4	7364	M. Conrad	enthält loxP Erkennungsstelle, frt flankierte Neo-Resistenz-Kassette und Thymidinkinase-Kassette

### 2.5.2.2 Eigene Plasmide

Name	Größe (Bp)	Ausgangsvektor	Modifikation
pCJ1	4277	Cosmid Klon MPMGc121I07462Q2 und pBluescript	rechter homologer Arm über <i>XmaI</i> und <i>EcoRV</i> einkloniert
pCJ2	8692	pCJ1 und pPNT4	rechte <i>XhoI</i> Erkennungsstelle entfernt, <i>EcoRI</i> Erkennungsstelle dazugefügt
pCJ3	9628	Cosmid Klon MPMGc121I07462Q2 und pBluescript	DNA-Fragment von TR1 zwischen zwei <i>HindIII</i> Erkennungsstellen kloniert
pCJ4	8856	pCJ3 und pBluescript	linker homologer Arm des TR1-Konstrukt zwischen <i>HindIII</i> und <i>XmaI</i>
pCJ4+L	8919	pCJ4 und pBluescript	Zufügen eines synthetischen Linkers mit loxP, <i>AseI</i> und <i>EcoRV</i> Erkennungsstellen
pCJ5	7365	Cosmid Klon MPMGc121I07462Q2 und pBluescript	mittleres Stück zwischen zwei <i>XmaI</i> Erkennungsstellen eingebracht
pCJ6	13326	pCJ5 und pCJ4+L	Zufügen von loxP, <i>AseI</i> , <i>EcoRV</i> Stellen
pCJ7	19063	pCJ2 und pCJ6	Zusammenfügen durch <i>XhoI</i> und <i>NotI</i> bzw. <i>Sall</i> und <i>NotI</i>



### Abbildung 3: Ausgangsvektor für konditionales *Gene Targeting*.

Exemplarisch ist hier die Genkarte des Vektors pPNT4 dargestellt, der im Gegensatz zum häufig verwendeten pPNT Vektor eine Neomycin-Resistenzkassette enthält, die zusätzlich mit frt-Erkennungsstellen flankiert ist. Dargestellt sind Restriktionsendonukleasen, die jeweils nur einmal im Vektor schneiden. (Abk.: frt = Erkennungsstelle für Flp-Rekombinase; loxP = Erkennungsstelle für Cre-Rekombinase; neo = Neomycin-Phosphotransferase (positiver Selektionsmarker); TK = Thymidin-Kinase (negativer Selektionsmarker); PGK-1prom bzw. -term = Phosphoglycerinkinase1-Promotor bzw. -Polyadenylierungssignal )



### 2.5.3 Desoxy-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried b. München, synthetisiert.

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
Oligo TR1-1	TGGCCATTGGAATGGACAGTCC CATCC	In Kombination mit Oligo TR1-3 Herstellung einer DNA-Sonde mittels PCR, Isolierung des gewünschten TR1-DNA-Bereichs aus genomischer Bank
Oligo TR1-3	AGGCCAGTGACTTCATGGACGC ATGCC	In Kombination mit Oligo TR1-3 Herstellung einer DNA-Sonde mittels PCR, Isolierung des gewünschten TR1-DNA-Bereichs aus genomischer Bank
Oligo TR1-8	TATGCAAAAATAATCTGCAACC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-9	AGTGTGGGCTGACTAAGCAGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-10	GTCTGGCTGCTGAGGTTAAGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-11	GCAGCATCGCACTGGGGTCACC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-12	AAGCCCACGACACGTTCATCG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-13	CCAGCTGCTGCTTAGTCAGCC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-14	TTAACCTCAGCAGCCAGACTGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-15	GGTGACCCCAGTGCGATGCTGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-16	CATTCACAGGCAAGTGGCTCTTC C	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-17	GGGTTAATGATACTAGAGATAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-18	ACTACAAACTGAGCATGGCGAC TGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-19	TCTACCCCACAAGAAGGAGTATA CG	Sequenzierung der Cosmidklone

---

Oligo TR1-20	TCCCTTGTTACACCTTGACAGGCAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-21	TGGCTGCAGGCCAACGTTTCAGTGGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-22	TACATCAGACGACCTGGAGTTTGGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-23	AGTGCTCCTAAAGCCAGGCACAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-24	GTGCTTGTGTGTATAGGCACATAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-25	ACGCATGCCTGTGATGCTCTGCAC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-26	CTGCTGTGAACCGTATCTGCACTGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-27	TCCCTTGTTACACCTTGACAGGCAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-28	GTCTCTGTAACCCCAGTATGAGGTGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-29	TACTGGGGTTACAGAGACATGCCACC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-30	AGGTTCTGTGTTGTCTGGAAGTCAGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-31	GAGCAAGCAGGGACTGAGTAAGCCG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-32	AGCAGAACATCCTCTCCTGTGTCTGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-33	AGTGTCTTGCAAGCATGGTGCTGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-34	GGAGGGTCAGAAGTTCAGAGTCGCG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-35	TGGCAGTGTTCTGGCAAGCATGTGTGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-36	ACACAGTGCTTTCCCACAGCTGTGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-37	ATTAGGCTGGCAAGATGCCTCAGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-38	CTGTGCTGACGTCACCTCGGTAAACC	Herstellung einer DNA-Sonde (PR2) außerhalb des rechten Arms und Sequenzierung der Cosmidklone

---

Oligo TR1-39	GTATGTACTCATGGTAGTCTGGA GGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-40	GGAGGTGAGTGTCTGAGACTAT AGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-41	TGCCTCCCAGGTATTCCAGACC C	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-42	CAGGGACTGAGTAAGCGGGCAG ACC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-43	TGTTCTGGCTGGGGGTTCTCAG GG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-44	TTGCTATTGTAAAGAGAGGGTG G	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-45	CGATGTAAGTGCGGCGACGGGT C	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-46	AAGACCCGTCGCCGCACTTACA TCG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-47	CCTCCCACCCCCATCCATAACG CC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-48	TTACCCAGGTCCCTCTCTTTTGC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-49	GGAGAAAGGACCAGGGAAACCA AGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-50	CTGAAATAATTTTATGGGGGTGG	Herstellung einer DNA-Sonde mittels PCR (PL1) außerhalb des linken Arms
Oligo TR1-51	GCATCGGCTTCTTCTGGCACC	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-52	CAGGTCTGTTTGTCCCACAAGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-53	TCCTTGTGGGACAAACAGACC	Herstellung einer DNA-Sonde mittels PCR (PL1) außerhalb des linken Arms
Oligo TR1-54	AACTTACACTCGCAGGTAACAAT CGG	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-55	GGTGACTTCACGGTGTGGATGG C	Sequenzierung der Cosmidklone
Oligo TR1-56	GTCACAGCGTGCTTTCTCAGTCC	Herstellung einer DNA-Sonde mittels PCR (PR2) außerhalb des rechten Arms
Oligo TR1-57	CGGGCAGGTTTTGAGATTTCC	Sequenzierung der Cosmidklone

Oligo TR1floxfor 1	TCCACCTCACAGGAGTGATCCC	Genotypisierung der Tiere des Maus-Stammes "FÜNF"
Oligo TR1 floxrev1	TGCCTAAAGATGAACTCGCAGC	Genotypisierung der Tiere des Maus-Stammes "FÜNF"

## 2.6 DNA Sonden

Name	Zur Herstellung benutzte Oligonukleotide und entsprechende DNA- Matrix	Zweck
T4	Oligo TR1-1, Oligo TR1-3, cDNA aus Maushoden	Isolierung des 3'-Bereichs des TR1-Gens aus genomischer Bank
PL1	Oligo TR1-50 und Oligo TR1-53, DNA aus embryonalen E14 Stammzellen der Maus (129/ola)	linke Probe, Verifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone, bindet außerhalb des linken Arms
PR2	Oligo TR1-38 und Oligo TR1-56, DNA aus embryonalen E14 Stammzellen der Maus (129/ola)	rechte Probe, Verifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone, bindet außerhalb des rechten Arms
neo Probe	aus Plasmid mit dem Gen für Neomycin-Phosphotransferase isoliert  (freundlicherweise von M.Conrad zur Verfügung gestellt)	bindet Teile des Neomycin-Resistenzgens

## 2.7 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus

Die in dieser Arbeit verwendeten E14 ES-Zellen, die aus Blastozysten von 129/ola Inzuchtmäusen gewonnen wurden, wurden freundlicherweise vom Institut für Entwicklungsgenetik, GSF Neuherberg, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden in unserem Labor bereits mehrfach erfolgreich für die Etablierung von Knock-outs anderer Vertreter der Selenoproteine verwendet. Deshalb wurden sie auch für den in dieser Arbeit beschriebenen TR1-Knock-out herangezogen.

## 2.8 Materialien für die ES-Zellkultur

Für die ES-Zellkultur wurden ausschließlich Einmalpipetten und Einmalzellkulturschalen aus Plastik benutzt. Alle ES-Zellkulturmedien und Substanzen wurden von GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe bezogen.

ES-Zell Medien / Substanzen	Verwendung
DMEM (Dulbecco's Mode Eagle Medium)	Zellmedium
LIF ("Leukemia inhibitory factor")	hemmt Differenzierung der ES-Zellen
Fibroblasten-Medium	500 ml DMEM, 2 mM Glutamin, 57 ml FKS, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren
ES-Zell Medium	500 ml DMEM, 2 mM Glutamin, 1000 U/ml LIF, 0,1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 75 ml ES-FCS (hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C), Böhringer, Mannheim
2x Einfriermedium	80% FCS, 20% DMSO

## 2.9 Blastozysten

Die Blastozysten für die Injektion von ES-Zellen zur Herstellung von chimären Mäusen wurden durch Uterusspülung aus C57BL/6-Mäusen gewonnen. Dazu wurden C57BL/6-Weibchen drei Tage p.c. euthanasiert, die Uteri entnommen und mit Medium gespült.

## 2.10 Materialien für die Histologie/ Immunhistochemie

Material	Vertrieb
Objektträger „Super Frost“	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Objektträger «Super Frost Plus»	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Paraffin	Vogel GmbH & Co. KG, Giessen
Einbettkassetten	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Deckgläser	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Histokitt	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
PCNA Antikörper	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Vectastain ABC kit	Vector Laboratories, Linaris, Wertheim

## 2.11 Materialien für den CFU assay

Material	Bezugsquelle
Iscoe´s Modified Dulbecco Medium (IMDM)	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Zytokin-Mix (siehe 3.5.4)	freundlicherweise von Ursula Just, GSF München, zur Verfügung gestellt
Methylcellulose (MethoCult™)	Stem Cell Technologies, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Sofern hier nicht im Detail geschildert, wurden die gängigen Methoden wie zum Beispiel Bakterien-Transformation, Präparation von Plasmid-DNA etc. nach (Sambrook 1989) oder gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt.

#### 3.1.1 Standard PCR („Polymerase Chain Reaction“) Bedingungen

Die Anwendung der PCR diente in der vorliegenden Arbeit v.a. zur Generierung von DNA-Sonden und zur Genotypisierung von Mäusen. Dabei wurde immer ein Standard-Protokoll verwendet, das in Tabelle 6 und in Tabelle 7 beschrieben ist und nur bezüglich der Annealing-Temperatur entsprechend den Schmelzeigenschaften der Primer und der Elongationszeit entsprechend der zu erwartenden PCR-Produktgröße optimiert wurde.

<b>1 Zyklus</b>	<b>35 Zyklen</b>			<b>1 Zyklus</b>	
	Denaturierung	Annealing	Elongation		Ab-
3 min	20 sec	20 sec	30 - 180 sec	7 min	kühlen
95°C	95°C	59-65°C	72°C	72°C	

**Tabelle 6: Standard PCR Bedingungen**

#### **PCR-Reaktionsvolumen: 50 µl**

10 µl dNTPs (1 µM)

3 µl 5' Primer (5 mM)

3 µl 3' Primer (5 mM)

MgCl<sub>2</sub> nach Angaben des Herstellers

10x Puffer nach Angaben des Herstellers

Taq-Polymerase nach Angaben des Herstellers

Aqua dest. ad 50 µl

**Tabelle 7: Ansatz für eine PCR-Reaktion**

### 3.1.2 Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden nach dem Protokoll von Inoue hergestellt (Inoue, Nojima et al. 1990). Eine Bakterienvorkultur wurde in 250 ml SOB Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben verdünnt und bei 30°C unter Schüttelbewegungen (200–250 rpm) für mehrere h inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,6$  wurden die Bakterien für 10 min auf Eis gestellt, danach für 10 min bei 4°C zentrifugiert (2500 g) und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert und die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis gestellt. Dann folgte wieder eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet diesmal in 20 ml eiskaltem TB resuspendiert. Dann wurde eiskaltes DMSO als Kryoprotektivum mit einer Endkonzentration von 7% zugefügt und davon Aliquots von 0,1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakterien wurden bis zur Transformation bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 100 µl Bakterien auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA vermischt, eine halbe Stunde auf Eis belassen und dann für 1 min bei 42° inkubiert. Dies soll zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien führen. Danach wurden die Bakterien direkt in 0,9 ml SOC-Medium überführt und für 1 Stunde bei 37° C im Bakterieneschüttler inkubiert. Daraufhin konnten die Bakterien auf Agarplatten ausplattiert werden. Die Agarplatten enthielten zur Selektion der transformierten Bakterien entsprechend dem Resistenzgen des Vektors Antibiotika, zumeist Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin 25 µg/ml). Die Platten wurden dann über Nacht bei 37° C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien sichtbar.



---

SOB	2 % (w/v) Bacto Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> pH 6.7 - 7.0
SOC (für die Transformation kompetenter Bakterien)	3 % SOC Supplement: 1/3 20 % Glucose 1/3 1 M MgCl <sub>2</sub> 1/3 1 M MgSO <sub>4</sub> 97 % SOB
TB (zur Herstellung chemokompetenter Bakterien)	10 mM Pipes oder Hepes 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl pH 6.7 mit KOH einstellen 55 mM MgCl <sub>2</sub> , sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

---

**Tabelle 8: Medien und Puffer für die Bakterienkultur**

### 3.1.3 Präparation plasmidaler und cosmidaler DNA

Alle Plasmid- und Cosmid-enthaltenden Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium angereichert und die DNA mittels eines Plasmid-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers präpariert.

### 3.1.4 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus embryonalen Stammzellen der Maus und verschiedenen Mausgeweben isoliert. Das Präparationsverfahren war dabei immer gleichartig, lediglich Volumina der verwendeten Puffer wurden der Zellzahl oder Gewebsgröße angepasst. Beispielhaft seien hier die Präparation von DNA aus ES-Zellen bzw. aus Mausschwanzspitzen aufgeführt.

#### 3.1.4.1 ES-Zell-DNA Präparation

ES-Zellklone wurden solange kultiviert, bis sie auf 96-Loch-Platten konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 50 µl Lyse-Puffer pro Loch lysiert. Die Platten wurden dazu über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55°C inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zufügen von 125 µl eines NaCl/Ethanol-Gemischs pro Loch [15 µl einer 5 M Kochsalzlösung pro ml 100 % Ethanol p.a.) für 30 min bei leichtem Schütteln. Danach wurde die präzipitierte DNA 5 min bei 2500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Kippen der Platten verworfen. Dann folgten zwei Waschschrte mit jeweils 70 % Ethanol p.a. mit dazwischenliegender Zentrifugation. Die präzipitierte DNA wurde getrocknet und anschließend für die Genotypisierung mittels Southern Blot mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut.

#### 3.1.4.2 DNA Präparation aus Mausschwanzspitzen

Ein etwa 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze wurde in 300 µl Lyse-Puffer für mindestens 3 h bei 55°C inkubiert. Nach Auflösen des Gewebes wurden die Haare abzentrifugiert und 200 µl des Überstandes mit 500 µl eines Ethanol/Kochsalz-Gemisches (15 µl einer 5 M Kochsalzlösung pro ml 100 % Ethanol p.a.) vermischt und die DNA ausgefällt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2500 g wurde der Überstand verworfen und das DNA Pellet mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl TE aufgenommen. Dieses Verfahren erwies sich als ausreichend für die weitere Verwendung der DNA für Genotypisierungen mittels PCR.

---

1-fach TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA 10 mM NaCl 0,5 % SDS 200 µg/ml Proteinase K unmittelbar vor Verwendung zufügen

---

### 3.1.5 Southern Blot

In der Regel wurden 10 µg genomischer DNA mit Restriktionsenzymen für mindestens 8 h in einem Reaktionsvolumen von 30 µl verdaut. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches erfolgte nach Angaben des Enzymherstellers. Die verdaute DNA wurde mit 3 µl 10-fach Ladepuffer vermischt und in einem 1-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch in 1-fach TAE-Puffer aufgetrennt (80 V, mindestens 3 h). Anschließend wurde das Gel für 10 min in 0,25 N HCl geschüttelt, um Strangbrüche in die DNA einzuführen, was den DNA-Transfer auf die Membran erleichtert. Danach wurde das Gel 2 h in alkalischem Transferpuffer geschüttelt und dadurch die DNA denaturiert. Für den DNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N+) wurde das Gel auf eine Plastikunterlage gelegt und die Nylonmembran unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Darüber wurden zwei in Transferpuffer getränkte 3MM Papiere, eine mindestens 5 cm hohe Lage von Zellstoff und zuoberst eine Glasplatte zum Beschweren aufgelegt. Dieser Aufbau wurde über Nacht belassen, wodurch Diffusionskräfte den DNA-Transfer auf die Membran ermöglichen. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2-fach SSC-Puffer geschwenkt und 20 min in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Anschließend wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde in Hybridisierungspuffer für mindestens 8 h im Rotationsofen bei 65°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran dreimal je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die gewaschene Membran wurde in Frischhaltefolie verpackt und über Nacht in Expositionskassetten autoradiographiert.

---

10-fach Ladepuffer	Glycerin	50 %
	Bromphenolblau	0.4 %
	Xylene Cyanol	0.4 %
50-fach TAE-Puffer	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	18,6 g	EDTA
	ad 1000 ml Aqua dest.	

---

---

Denaturierungs- lösung	0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
Waschpuffer	0.5-fach SSC 0.1 % SDS
20-fach SSC-Puffer	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
Hybridisierungs- puffer	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 % SDS 1 mM EDTA

---

### 3.1.6 Generierung und radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Um diejenigen Cosmidklone auf den genomischen DNA-Filtern identifizieren zu können, die Teile des TR1-Gens enthielten, wurde eine TR1-spezifische DNA-Sonde benötigt. Die Primer zur Generierung der DNA-Sonde mittels PCR wurden so gewählt, dass ein etwa 500 bp großes DNA-Fragment, welches einen Teil des kodierenden Bereichs der mRNA der TR1 umfasst, amplifiziert werden konnte. Als DNA-Matrix für die PCR wurde die Gesamt-cDNA eines Maushodens verwendet. Die DNA-Sonde wurde mit  $\gamma$ -ATP durch Verwendung eines Markierungskits (random primed DNA labeling kit) radioaktiv markiert und über eine Sephadex G50 Trennsäule von den nicht inkorporierten Nukleotiden abgetrennt.

### 3.1.7 Hybridisierung von DNA-Filtern und Auswertung

Für die Hybridisierung der DNA-Filter des RZPD wurden dieselben Puffer wie bei den Southern Blots angewendet. Die DNA-Filter wurden für 20 min mit Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Dann wurde frischer Hybridisierungspuffer mit denaturierter, radioaktiv markierter DNA-Sonde vermischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Rotationsofen. Am nächsten Tag wurden die Filter dreimal für 15 min bei 65°C mit Waschpuffer gewaschen und in Frischhaltefolie verpackt. Die Autoradiographie erfolgte wie bei den Southern Blots. Nach der Entwicklung der Filme waren bereits nach 4 h Exposition positive Signale in Form von Doppelspots (vgl. Abbildung 4) zu erkennen.



**Abbildung 4: Cosmidklon als Doppelspot, der die gesuchte Gensequenz enthält**

Durch die Koordinaten der positiven Signale konnten nach Anleitung der Filterhersteller (RZPD) die entsprechenden Bakterienklone identifiziert werden.

## **3.2 Gene targeting**

### 3.2.1. Strategie der Geninaktivierung

Zur Strategie der Inaktivierung der TR1 in der Maus wurden folgende Überlegungen angestellt. Im Wesentlichen bestehen drei Möglichkeiten, um ein Gen in seiner Funktion beeinflussen zu können. Erstens der komplette Genverlust durch Deletion des gesamten Gens, zweitens die Manipulation des Promotors und Enhancerbereiche oder drittens die Manipulation bestimmter Genbereiche, die für die Funktion des entsprechenden Enzyms essentiell sind. Generell gilt die Exzision des kompletten Gens als sicherste Variante um eine Genfunktion auszuschalten. Allerdings bereitet dies technische Schwierigkeiten, wenn das Gen beispielsweise sehr groß oder hinsichtlich möglicher Überlappung zweier Gene oder anderer Eigenschaften

noch nicht genau charakterisiert ist. Favorisiert man die zweite Möglichkeit, den Promotor zu benutzen, dann müssen zu Beginn der Strategieführung entsprechend genaue Informationen über den Promotor oder die Promotoren eines Gens und am besten auch über die ersten Exone vorliegen. Dabei müssen auch eventuelle alternative Spleißvarianten eines Gens bedacht werden. Im Falle eines sehr großen Gens kann man sich auf funktionell wichtige Abschnitte eines Gens beschränken und durch Deletion eines solchen Abschnittes charakteristische Genfunktionen manipulieren, z.B. im Falle von Enzymen die Genbereiche, die für Substratbindestellen kodieren. In der Regel erwartet man dadurch eine erhebliche Funktionsbeeinträchtigung von Enzymen.

### 3.2.2 Design des *Gene targeting* - Konstruktes für konditionale Geninaktivierung durch Verwendung des loxP / Cre-Rekombinase System

Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym, das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt (Übersicht in (Nagy 2000)), aber auch gut in Säugetierzellen funktioniert (Sauer und Henderson 1988). Die Cre-Rekombinase erkennt eine spezifische 34 bp lange Nukleotidsequenz, die man als „loxP“-Stelle bezeichnet (Abremski und Gottesman 1981). Zwischen zwei solchen loxP-Stellen befindliche DNA-Bereiche können bei gleicher 5'-3'-Orientierung der loxP-Sequenzen durch Aktivität der Cre-Rekombinase entfernt werden. Solche loxP Erkennungssequenzen wurden bei der in dieser Arbeit beschriebenen *Gene targeting* - Strategie verwendet, um später genetisch veränderte Mäuse etablieren zu können, bei denen die Inaktivierung des Gens durch Cre-Rekombinase Expression gesteuert wird. Dabei kann sich die Inaktivierung des Gens auf den gesamten Tierkörper auswirken oder auch nur auf bestimmte Gewebe und/oder bestimmte Zeitpunkte beschränken.

Des weiteren muss ein *Gene targeting* - Vektor sogenannte „homologe Arme“ für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen enthalten. Der Abschnitt des *Gene Targeting* - Vektors, der von den homologen Armen umspannt wird, kann so gezielt in das Genom der embryonalen Stammzellen rekombiniert werden („Site specific recombination“). Für die homologe

Rekombination des *Gene targeting* - Konstruktes in ES-Zellen der Maus sollten diese homologen DNA-Abschnitte empirisch ermittelt zusammen mindestens 6 kBp betragen. Um homolog rekombinierte ES-Zellklone in vitro stark anreichern zu können, wurden zwei Selektionsmarker verwendet: Als „positiver Selektionsmarker“ diente ein Neomycin-Phosphotransferase-Resistenzgen: Homolog rekombinierte Zellen hatten dadurch in Neomycin-haltigem ES-Zellmedium einen Wachstumsvorteil. Im lebenden Tier dagegen könnte das mitgeführte Neomycin-Resistenzgen unbeabsichtigte Effekte hervorrufen, daher wurde das Neomycin-Gen von *frt*-Erkennungsstellen flankiert. Das *frt*/Flp-Rekombinase System ähnelt dem Cre-lox-System. Es ermöglichte die nachträgliche Exzision des Neomycin-Resistenzgens durch Zucht mit Flp-Rekombinase-transgenen Mäusen.

Das Thymidinkinasegen („Tk-Gen“), ursprünglich von Herpesviren stammend, lässt Zellen gegenüber Gancyclovir empfindlich werden. Bei der homologen Rekombination von ES-Zellen mittels Elektroporation kommt es häufiger zu ungezielter Integration von zellfremder DNA als zur gezielten homologen Rekombination. Daher sollte das Tk-Gen als „negativer Selektionsmarker“ dienen, d.h. integrierten die ES-Zellen den gesamten *Gene Targeting* - Vektor, so würde auch das außerhalb der homologen Arme befindliche Tk-Gen integriert. Der Zusatz von Gancyclovir in Zellmedium sollte die Proliferation solcher ES-Zellklone hemmen, die durch ungezielte Integration Neomycin-resistent waren.

### **3.3 Methoden der embryonalen Stammzellkultur**

Die ES-Zellkultur wurde gemäß den Anleitungen von Joyner et al. durchgeführt (Joyner 1999). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die ES-Zellen grundsätzlich immer mit embryonalen Fibroblasten („Feeder-Zellen“) kokultiviert wurden. Der Zusatz von *Leukemia inhibitory factor* zum Zellmedium sollte die Differenzierung der ES-Zellen erschweren. Die verwendeten Zellinkubatoren wurden konstant bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck und Wasserdampfsättigung gehalten. Alle Zentrifugationsschritte der ES-Zellen erfolgten bei 270 g für 4 min.

### 3.3.1 Elektroporation von embryonalen Stammzellen

Zwei mit ES-Zellen zu 50-70 % konfluent bewachsene 10 cm Zellkulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Elektroporation wurden 7 Millionen Zellen in PBS und 20 µg linearisierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 900 µl vermischt und in gekühlte Küvetten überführt. Die Elektroporation wurde mit einem *Gene Pulser* - Gerät (Bio Rad) durchgeführt, in welches Küvetten mit 0,4 cm Elektrodenabstand eingesetzt werden konnten. Die Elektroporation der Zellen erfolgte bei 240 V und 500 µF und die dabei ermittelten Zeitkonstanten des die Zellen durchdringenden Stromimpulses wurden notiert. Die Küvetten wurden anschließend für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die ES-Zellen wieder in ES-Zellmedium überführt, auf vier 10 cm-*Feeder*-Platten mit unterschiedlicher Zelldichte ausgesät und wie unter 3.3.2 beschrieben homolog rekombinierte ES-Zellklone selektiert.

---

20-fach PBS	2,74 M NaCl
	30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	54 mM KCl
	130 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,5

---

**Tabelle 9: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)**

### 3.3.2 Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone

Zwei Tage nach der Elektroporation begann die Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone durch Zusatz von Neomycin und Gancyclovir ins Zellkulturmedium. Am achten und neunten Tag der Selektion wurden Einzelkolonien sichtbar und diese einzeln mit einer Pipette von der Kulturschale gepickt und in 96-Loch-Platten transferiert. Bei der Auswahl der Kolonien wurde darauf geachtet, dass nur Kolonien mit klar abgegrenzter Oberfläche, ein Indiz für undifferenzierten Zustand, gepickt wurden. Außerdem wurden hauptsächlich kleine bis mittelgroße Kolonien



ausgewählt, da sehr schnell wachsende, große ES-Zellkolonien erfahrungsgemäß häufig Aneuploidie aufweisen.

Die Einzelzellklone in den 96-Lochplatten wurden am nächsten Tag trypsiniert, um die Zellen zu vereinzeln. Nach weiteren zwei oder drei Tagen Inkubation wurden vier Replikas eines jeden Zellklons hergestellt, d.h. die Zellen einer 96-Loch-Platte wurden auf zwei mit Fibroblasten und zwei mit Gelatine beschichtete 96-Loch-Platten aufgeteilt. Die Zellklone auf den gelatinierten Platten dienten dabei der DNA-Gewinnung, um die Zellklone auf homologe Rekombination per Southern Blot verifizieren zu können. Die ES-Zellklone auf den *Feeder*-Platten wurden für eine spätere Expansion zunächst in DMSO-haltigem Einfriermedium bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert.

### 3.3.3 Auftauen und Expansion der ES-Zellklone

Nach Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone mittels Southern Blot wurden die Platten mit den entsprechenden Duplikaten der ES-Zellklone für die Expansion aufgetaut und sofort für 3 min abzentrifugiert. Das DMSO-haltige Einfriermedium wurde abgesaugt und stattdessen 150  $\mu\text{l}$  frisches ES-Zellmedium zugegeben. Die Expansion der positiven Klone erfolgte schrittweise von der 96-Loch- auf eine 48-Loch-, dann auf eine 24-Loch-, dann 6-Loch-, dann 6cm- und schließlich auf zwei 10cm-Platten. In der Regel wurden die Klone je nach Dichte für ein bis zwei Tage kultiviert, bevor sie auf die nächstgrößere Platte übertragen wurden. Die expandierten ES-Zellklone wurden je Klon in der Regel zu mindestens sechs Aliquots á 1ml eingefroren.

### 3.3.4 Blastozysteninjektion und Embryotransfer

Die Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozysten erfolgte freundlicherweise im Labor von W. Wurst, Institut für Entwicklungsgenetik der GSF, Neuherberg. Zwei bis drei Tage vor einer ES-Zellinjektion in Blastozysten wurden die Zellen aufgetaut und auf einer 6 cm-*Feeder*-Schale kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen durch 10minütige

Trypsinierung gut vereinzelt, in 0,5 ml Medium aufgenommen und auf 4°C belassen. Pro Blastozyste wurden zwischen 10 und 20 ES-Zellen mikroinjiziert. 16 bis 20 mit homolog rekombinierten ES-Zellen beladene Blastozysten wurden am selben Tag einer CD1-Empfängermaus in die Uterushornspitzen transferiert. Die CD1-Empfängermause waren zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart und einer Plugkontrolle unterzogen worden, um eine Scheinträchtigkeit zu induzieren. Die empirisch höchste Trächtigkeitsrate beim Blastozystentransfer erreicht man, wenn die Empfängerweibchen, denen die Blastozysten implantiert werden, sich am Tag 2.5 der Scheinträchtigkeit befinden.

### **3.4 Zucht der Mauslinien**

#### 3.4.1 Tierhaltung und Hygienestatus

Die Tierräume befinden sich im Biologikum der GSF, Neuherberg. Sie sind mit Gestellen und Typ II Polycarbonat Käfigen ausgestattet. Pro Käfig werden maximal 5 Mäuse gehalten. Die Tiere sitzen auf hochwertiger Labortiereinstreu (Altromin, Typ  $\frac{3}{4}$ ), die einmal wöchentlich gewechselt wird. Die Haltung der Tiere erfolgt unter standardisierten klimatischen Bedingungen. In den Tierräumen herrschen 21 (+/- 1) °C bei einer relativen Luftfeuchte von 55 (+/- 5 %). Diese Werte werden konstant überwacht und aufgezeichnet. Die Räume werden mit einer Luftwechselrate von 15-20 pro Stunde belüftet, die Zuluft ist HEPA-gefiltert. Der Lichtzyklus beträgt 12 Stunden (6:30 -18:30h, keine Sommerzeit). Die Tiere werden mit einer Standarddiät (Altromin 1314) *ad libitum* gefüttert. Sie erhalten durch 0.2 µm filtrierte teilentmineralisiertes Wasser *ad libitum*. Die Tiere werden unter SPF-Status gehalten und ihr Hygienestatus nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) regelmäßig untersucht (Nicklas, Baneux et al. 2002). Die hygienische Einheit, in der die Mäuse gehalten wurden, war im Zeitraum über den in dieser Arbeit berichtet wird (2000-2003) frei von allen in der zitierten FELASA-Richtlinie gelisteten Mauspathogenen bis auf Maus Hepatitisvirus („MHV“), Maus Parvovirus („MPV“; erster Test für MPV-

spezifische Antikörper im August 2002), *Helicobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* und *Corynebakterium kutscheri* (ein Sentinel in einem anderen Raum derselben hygienischen Einheit war im August 2002 positiv for *Corynebakterium kutscheri*). In einem anderen Raum derselben hygienischen Einheit wurden im Januar 2002 gastrointestinale Helminthen (*Syphacia spp.*) festgestellt. Die Mäuse des betroffenen Raums wurden mit Fenbendazol behandelt. Bei darauffolgenden Untersuchungen wurden keine Helminthen mehr festgestellt.

#### 3.4.2 Etablierung von konditionalen TR-Knock-out-Mausstämmen

Blastozysten, denen fremde embryonale Stammzellen injiziert werden, können sich zu genetischen Mosaiktieren, den sogenannten „Chimären“ entwickeln. Wie zuvor bereits erwähnt, stammten die verwendeten Blastozysten dem C57BL/6-Inzuchtmausstamm ab, der die schwarze Fellfarbe rezessiv vererbt. Die in Zellkultur veränderten und später in diese Blastozysten injizierten E14-ES-Zellen wurden hingegen von 129/ola Mäusen gewonnen. Dieser Mausstamm besitzt die dominant vererbare, bräunliche Fellfarbe Chinchilla (A). Dadurch war es möglich, Chimären nach der Geburt an ihrem gescheckten Haarkleid zu erkennen. Die Chimären wurden mit C57BL/6-Tieren verpaart, um die genetische Veränderung durch Vererbung an die nächste Generation als allelische Variante im Gesamtorganismus zu haben („Keimbahntransmission“). Nur aus der Verpaarung von Chimären (AA) mit C57BL/6-Mäusen (aa) stammende Nachkommen mit brauner Fellfarbe (Aa) können auch die genetische Veränderung tragen. Die Nachkommen mit brauner Fellfarbe wurden auf das konditionale Allel ( $TR^{wt/fl}$ , siehe Abschnitt 3.4.3) analysiert. Die Geschwister mit dem von loxP-Stellen flankierten konditionalen TR1-Allel ( $TR^{wt/fl}$ ) wurden untereinander verpaart, um  $TR^{fl/fl}$  Tiere zu erhalten.

### 3.4.3 Deletion des von loxP Erkennungsstellen flankierten (floxed) Genabschnitts durch Zucht mit Cre-Rekombinase-transgenen Mäusen

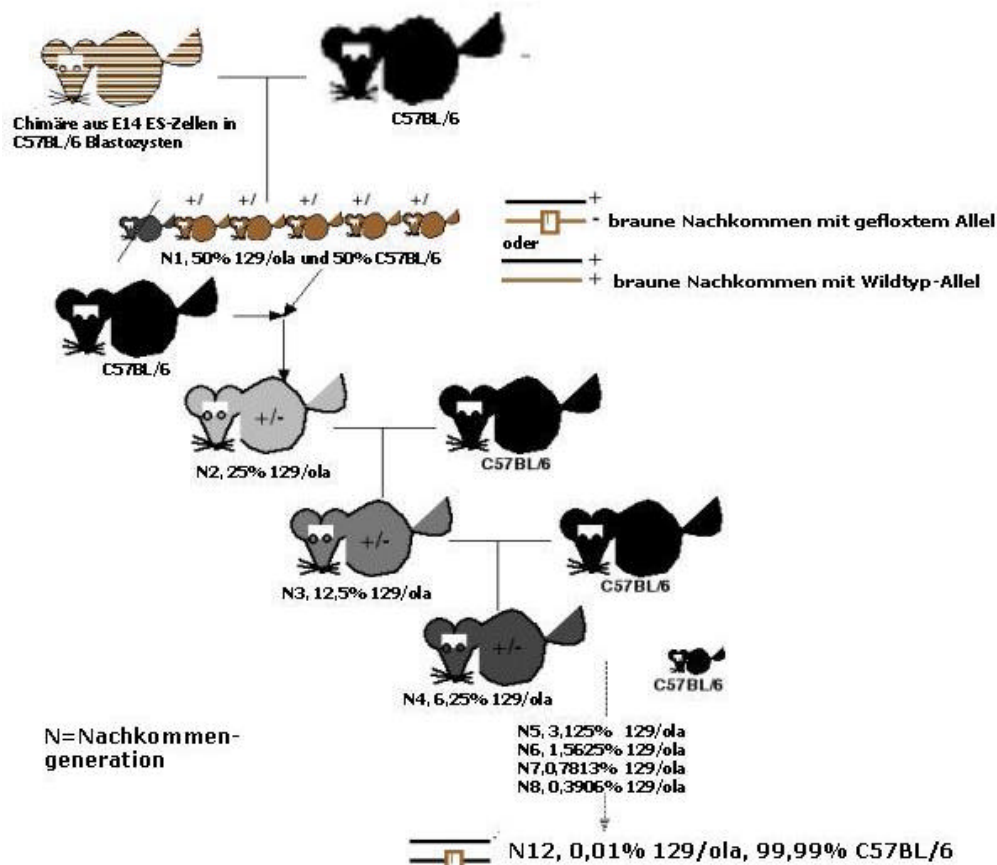
Bei einer konditionalen Knock-out-Maus wird die Wildtyp-Genstruktur zunächst nur minimal mit den sogenannten loxP-Erkennungsstellen verändert (Abremski und Gottesman 1981), um so die endogene Genexpression zunächst möglichst unbeeinflusst zu lassen. Bei den loxP Erkennungsstellen handelt es sich um eine 34 bp lange, palindromische Nukleotidsequenz („ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTAT“). Die ursprünglich aus Bakteriophagen stammende „Cre-Rekombinase“, ist ein Enzym, welches loxP-Stellen zu erkennen und DNA-Abschnitte zwischen zwei loxP-Erkennungsstellen zu deletieren vermag. Bei der Generierung eines konditionalen *Gene Targeting* - Konstruktes wird der DNA-Abschnitt eines Gens, der inaktiviert werden soll, zunächst von loxP-Erkennungsstellen flankiert, um diesen flankierten DNA-Bereich später durch Aktivität der Cre-Rekombinase zu deletieren. Die Inaktivierung des Gens erfolgt durch Kreuzen von konditionalen Knock-out-Mäusen (mit zwei loxP-Erkennungsstellen im Gen) mit Cre-transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase ubiquitär (Sauer und Henderson 1988), gewebespezifisch oder induzierbar exprimieren (Kuhn, Schwenk et al. 1995). Sowohl bei der TR1-Knock-out-Mauslinie als auch bei der TR2-Knock-out-Mauslinie erfolgte die Ausschaltung des konditionalen Allels erst durch Verpaarung mit Cre-transgenen Mäusen.

Dazu wurden Tiere mit konditionalen Allelen zunächst mit den ubiquitär Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen, den sogenannten „Deleter-Cre“-Mäusen verpaart. Der Deleter-Cre ist ein transgener Mausstamm (Schwenk, Baron et al. 1995), der die Cre-Rekombinase unter dem minimalen humanen CMV-Promotor sehr früh und in allen Geweben exprimiert. Verpaart man Deleter-Cre Mäuse mit Tieren, deren Gen auf einem Allel von loxP Erkennungsstellen flankiert ist ( $wt/fl$ ), entstehen in der ersten Nachfolgegeneration Tiere, die heterozygot ( $wt/del$ ) sind. Das Wildtyp( $wt$ )-Allel stammt dabei von dem Deleter-Cre Elterntier, das deletierte ( $del$ ) Allel von dem zunächst geflochten Tier ab.

#### 3.4.4 Genetische Konformität

Bei der Untersuchung von Genfunktionen durch Verwendung von gezielt genetisch veränderten Tieren ist es wünschenswert, genetische Variabilitäten soweit wie möglich zu minimieren. Daher wurden die TR-Knock-out-Mauslinien auf einen möglichst einheitlichen genetischen Hintergrund, in dieser Arbeit auf die C57BL/6-Inzuchtlinie rückgekreuzt. Die Physiologie und Pathologie der C57BL/6-Inzuchtmaus ist gut beschrieben ([www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml](http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml))<sup>1)</sup>, daher eignet sich dieser genetische Hintergrund zum Vergleich von TR-Knock-out- und Wildtyp-Tieren. Die kongene Zucht erfolgte dabei nach dem Schema in

Abbildung 5. Die Chimäre wurde mit einem C57BL/6-Tier verpaart. Aus einer solchen Verpaarung können sowohl schwarze als auch braune Nachkommen geboren werden. Nur die Tiere mit brauner Fellfarbe können von den injizierten ES-Zellen abstammen. Statistisch gesehen sollten 50% dieser Tiere ein genetisch verändertes Allel haben. Nur die genetisch veränderten Tiere werden mit C57BL/6 weitergezüchtet. In der sechsten Generation (N6) ist rein rechnerisch 98,5% des Genoms von C57BL/6 abstammend.



**Abbildung 5: Kongene Rückkreuzung auf C57BL/6**

### 3.5 Charakterisierung der TR-Knock-out-Tiere

Für die Analyse der  $TR^{\text{del}/\text{del}}$  Embryonen wurden zwei  $TR^{\text{wt}/\text{del}}$  Tiere verpaart. Zur Feststellung des Gestationsstadiums wurden täglich Vaginal-Pfropf-Kontrollen durchgeführt.

#### 3.5.1 Äußere Betrachtung der Embryonen

Die Muttertiere wurden durch zervikale Dislokation euthanasiert. Der Uterus wurde entnommen und in PBS gewaschen. Die Uteruswand wurde vorsichtig entlang der Uterushörner aufgeschnitten. Dabei wurde auf die Unversehrtheit der einzelnen Plazentome und Embryonalhüllen geachtet. Die einzelnen Plazentome wurden von der Uteruswand abgetrennt und in PBS gewaschen. Die Embryonen wurden unter dem Stereomikroskop mittels angeschlossener Digitalkamera (Carl Zeiss, Jena) aufgenommen.

### 3.5.2 Histologische Untersuchung der Embryonen

Am gewünschten Tag der Embryonalentwicklung wurden die Muttertiere euthanasiert und der Uterus entnommen. Bei E8.5 - E9.5 Embryonen wurde der ganze Uterus in Teile zu je 3-4 Plazentomen zerschnitten und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Embryonen ab E11.5 und älter wurden zunächst mit Diethylether euthanasiert und dann einzeln aus ihrem Dottersack isoliert. Ein 1-2 mm langes Stück vom Schwanz wurde abgetrennt, in PBS gewaschen und für die DNA-Gewinnung verwendet. Auch der Dottersack wurde für eine eventuelle Genotypisierung mittels Southern Blot eingefroren und für die DNA-Präparation aufbewahrt. Die Embryonen wurden mit 4% PFA fixiert. Tags darauf wurden sie in 70% Ethanol überführt und darin bis zur Paraffineinbettung aufbewahrt. Die Einbettung der Embryonen begann mit der Entwässerung der Embryonen durch eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Embryonen für 60 min in 80%igem Ethanol, dann für 60 min in 90%igem Ethanol, 60 min in 100%igem Ethanol und zuletzt für 60 min in Xylol unter leichtem Schütteln inkubiert wurden. Daraufhin wurden sie über Nacht bei 58°C in flüssigem Paraffin belassen, bevor sie in Paraffinblöcke gegossen wurden. Nach Aushärten der Paraffinblöcke wurden am Mikrotom Dünnschnitte von 5-10 µm Schnittdicke hergestellt. Für die Immunhistochemie wurden Lysin-beschichtete Objektträger verwendet. Die Paraffinschnitte wurden soweit nicht anders angegeben mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt.

### 3.5.3 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Paraffinschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 15 min, 100% Ethanol 10 min, 95% Ethanol 10 min, 80% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min, PBS 10 min) entparaffinisiert und gewässert. Anschließend wurde die endogene Aktivität von Peroxidasen durch 15-minütige Behandlung mit Wasserstoffperoxid (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol) inaktiviert. Daraufhin wurden die Objektträger für 20 min in 5-prozentigem Pferdeserum in 1-fach PBS belassen, um unspezifische Epitope abzudecken. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min mit dem primären Antikörper bei 37°C in einer feuchten Kammer

inkubiert. Es folgte ein dreimaliges, je 5-minütiges Waschen der Objektträger mit 5-prozentigem Pferdeserum in PBS. Danach folgte die Inkubation (37°C, 60 min) mit dem Biotin-gekoppelten, sekundären Antikörper. Wiederum wurde dreimal für 5 min mit 1-fach PBS gewaschen. Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurde ein Kit, bestehend aus Avidin und Meerrettich-Peroxidase verwendet, welche zusammen einen Komplex bilden, der in der Lage ist, das an den sekundären Antikörper gekoppelte Biotin zu binden (Vectastain, Vector Laboratories). Durch die irreversible Bindung dieses Komplexes an Biotin werden die Zellen, die den primären Antikörper gebunden haben, durch Substratumsetzung (Diaminobenzidin-Chromogen) braun gefärbt.

#### 3.5.4 „Colony Forming Units“ („CFU“) Experiment

Zur Untersuchung der fetalen Hämatopoese wurde die Leber von E13.5 Embryonen entnommen und in 0,5 ml Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) mit 20% FCS aufgenommen. Durch mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle mit 0,45 mm Innendurchmesser konnte eine Lebereinzelsuspension hergestellt werden. Die Suspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 3 min) und das Zellpellet in 1 ml 2-fach Hämolysepuffer (verdünnt mit IMDM ohne FCS) aufgenommen. Bereits differenzierte Blutzellen sind gegenüber Hämolyse empfindlicher als Blutstammzellen, diese sollten durch milde Hämolyse eliminiert werden. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (wie oben), das Pellet in 200 µl IMDM mit FCS aufgenommen und die Zellzahl mit der Trypanblau-Ausschlußmethode bestimmt. Jeweils 4000 Zellen wurden mit 1 ml Methylcellulose-Zytokin-Mix vermischt und in 35mm Zellkulturschalen für 7 Tage inkubiert. Die Kolonien (mehr als 50 Zellen pro Kolonie) wurden in fünf verschiedene Klassen eingeteilt: erythroide, granulozytäre, makrophagozytäre, Makrophagen-granulozytäre und gemischte Kolonien, wobei letztere aus mindestens drei verschiedenen Zelltypen bestanden. Die Kolonien wurden den Klassen zugeteilt, gezählt und bei 50-facher Vergrößerung fotografiert.



### **10-fach Hämolysepuffer**

---

NH<sub>4</sub>Cl: 41,5 g  
KHCO<sub>3</sub>: 5 g  
EDTA TitriplexIII: 185 mg  
auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen  
mit KOH (5 N) auf pH 7,4 einstellen  
steril filtrieren mit 0,22 µm Filter

---

### **Methylcellulose-Zytokin-Mix**

---

40 ml Methylcellulose wurden versetzt mit:

---

BSA (Böhringer für Zellkultur, 652237)	10%
FCS (vorgetestet auf hämatopoetische Differenzierung)	20%
Penicillin/Streptomycin	1%
Glutamin	1%
β-Mercaptoethanol	50 µM
Maus IL3 konditioniertes Medium	100 U/ml
Erythropoetin (Epo)	2 U/ml
Stammzellen Faktor (SCF)	10 ng/ml
FLIT Ligand (FL)	10 ng/ml
Thrombopoetin (TPS)	10 ng/ml
Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GMCSF)	10 ng/ml (Roche 10 <sup>4</sup> U = 1 µg)
Interleukin 6 (IL 6)	10 ng/ml (Roche 10 <sup>5</sup> = 1 µg)

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 TR1

#### 4.1.1 Genstruktur der TR1

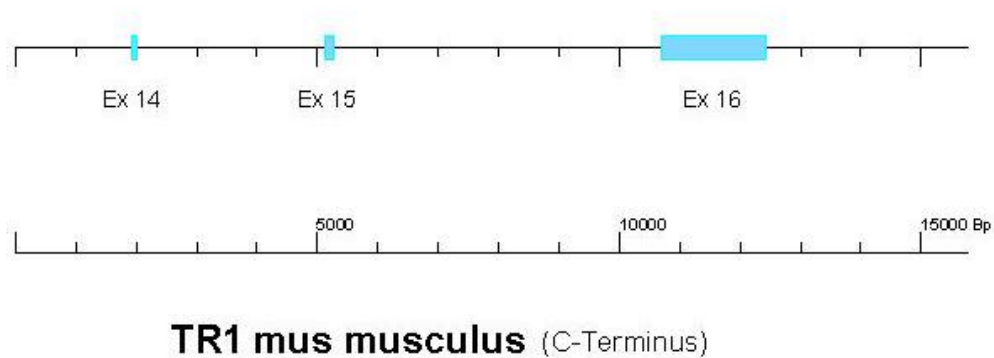
Um das Gen der TR1 genetisch manipulieren zu können, mussten zunächst die entsprechenden DNA-Bereiche isoliert und die Nukleotidsequenz ermittelt werden. Die DNA-Filter vom RZPD Berlin, auf denen das gesamte Maus-Genom in Form von Cosmidklonen in einem definierten Koordinatensystem aufgespottet ist, wurden mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die spezifisch für den 3'Bereich der TR1 der Maus ist. Insgesamt konnten so fünf Bakterienklone identifiziert werden, die genomische DNA-Abschnitte im 3'Bereich der TR1 enthielten (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Bakterienklone des RZPD**

MPMGc121E08418Q2 (Filter Nr. 78-13-136)
MPMGc121M02328Q2 (Filter Nr. 78-12-123)
MPMGc121I07462Q2 (Filter Nr. 78-14-117)
MPMGc121H2014Q2 (Filter Nr. 78-1-505)
MPMGc121M09120Q2 (Filter Nr. 78-1-528)

Das DNA-Insert des Cosmid-Klons MPMGc121I07462Q2 wurde sodann partiell sequenziert (Sequiseive, Vaterstetten). Die für die erste Sequenzierungsrunde benötigten Oligonukleotide konnten nur anhand der publizierten cDNA-Sequenz der murinen TR1 (AB027565.1 GI:6467192, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt werden, da zum damaligen Zeitpunkt keine Informationen über die genomische Sequenz der TR1 der Maus vorhanden waren. Durch Sequenzvergleiche der Maus-cDNA mit humanen genomischen DNA-Sequenzen (Altschul, Gish et al. 1990), konnten die Lage und Größe der Exone, sowie Intron- und Exongrenzen innerhalb der Maus-cDNA der TR1 annähernd bestimmt werden, was für die Auswahl der Oligonukleotide für die Sequenzierung wichtig war. Die TR1-cDNA der Maus erwies sich dabei zu 85% homolog zu den Exons im humanen TR1-Gen.

Ausgehend vom letzten Exon wurde die Sequenzierung des 3'Bereichs des murinen TR1-Gens begonnen. Es wurde insgesamt ein 15805 bp großer Sequenzbereich im Cosmid MPMGc121Io7462Q2 sequenziert. Der Vergleich dieser Insert-Sequenz mit der murinen TR1-cDNA-Sequenz bestätigte, dass dieses Cosmid den 3'Bereich des murinen TR1-Gens enthielt. Darüber hinaus konnte die genaue Exon-Intron-Struktur dieses Abschnitts des murinen TR1-Gens ermittelt werden (siehe Abbildung 6).

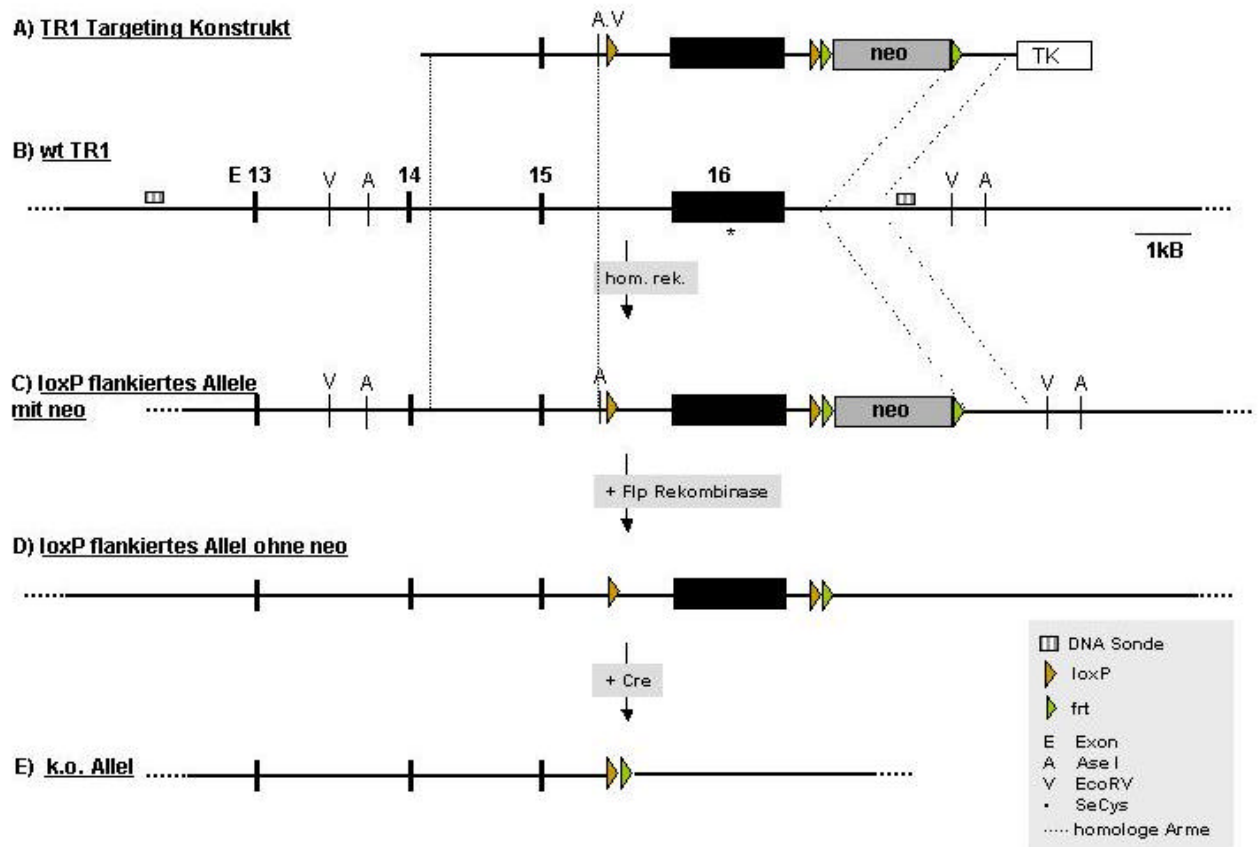


**Abbildung 6: Struktur des 3'Ende der TR1 der Maus**

Die Nummerierung der Exons erfolgte nachträglich nach Publikation der genomischen Struktur der TR1 der Maus durch Osborne und Kollegen (Osborne und Tonissen 2001), wobei Exon 16 das letzte Exon ist. Exon 16 besteht aus einem proteinkodierenden Teil und einem nicht-kodierenden Teil. Im kodierenden Bereich liegt das TGA-Triplett, das für Selenocystein kodiert. Der weitaus größere, nicht-kodierende Teil von Exon 16 enthält neben dem SECIS-Element auch das poly-A Signal (Signal zur Termination der Transkription der prä-mRNA). Außerdem befinden sich dort zusätzlich regulatorische RNA-Elemente (Gasdaska, Harney et al. 1999), die für die Stabilität der TR1-mRNA wichtig sind.

#### 4.1.2 *Gene Targeting* - Strategie

Zur Manipulation der Funktion der TR1 im Mausmodell wurde die Strategie des Ausschaltens funktionell wichtiger Genbereiche angewendet. Dabei richtete sich das Augenmerk auf das letzte Exon der TR1. Hier befinden sich zwei Sequenzbereiche, die für das C-terminale Redox Zentrum, bestehend aus den Aminosäuren Glycin-Cystein<sup>497</sup>-Selenocystein<sup>498</sup>-Glycin, kodieren. Zum anderen befindet sich dort das für den Einbau von Selenocystein notwendige SECIS-Element. Außerdem ist, wie bereits erwähnt, das Poly-A Signal auf Exon 16 lokalisiert. Somit konnte durch gezielten Verlust des letzten Exons die Funktion der TR1 ausgeschaltet oder zumindest erheblich beeinträchtigt werden. Für die Herstellung eines konditionalen TR1-Allels sollte das letzte Exon zunächst mit zwei loxP-Stellen flankiert werden (siehe Abbildung 7, C). Um diese genetische Veränderung durch homologe Rekombination in ES-Zellen einführen zu können, musste zunächst ein „*Gene Targeting* - Konstrukt“ erstellt werden (siehe Abbildung 7, A). Das Konstrukt bestand aus einem etwa 6 kBp langen, für die homologe Rekombination essentiellen 5'-Arm, dem mit loxP-Stellen flankierten letzten Exon (4,5 kBp) und dem etwa 1,3 kBp großen, homologen 3'-Arm.



### Abbildung 7: TR1 - Gene Targeting - Strategie

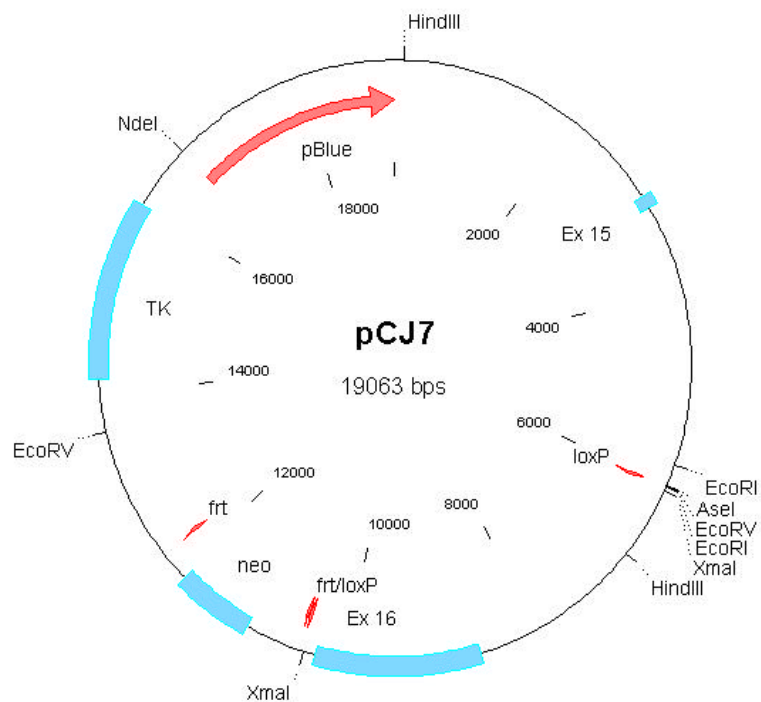
A): Die Lage des rechten und linken homologen Arms sind jeweils durch die gestrichelten Linien dargestellt. Das letzte Exon 16 der TR1 ist von zwei loxP-Stellen flankiert, daran anschließend befindet sich die von zwei frt-Erkennungsstellen flankierte Neomycin-Kassette. Außerhalb des rechten homologen Arms befindet sich das Thymidinkinase-Resistenzgen (TK). B): Die Wildtyp-Situation zeigt die Lage der Exons 13 – 16 und den Bereich der homologen Arme. Die für die Verifikation homolog rekombinierter ES-Zellklone notwendigen DNA-Sonden binden außerhalb der homologen Arme und innerhalb eines DNA-Fragmentes, das von zwei AseI (A) Restriktionsenzymsschnittstellen begrenzt wird. C): Dargestellt ist das in ES-Zellen erfolgreich homolog rekombinierte, konditionale TR1-Allel. In D): ist die durch Flp-Rekombinase vermittelte Deletion der Neomycin-Kassette gezeigt. E): Durch Verpaaren mit Cre-transgenen Mäusen kann das letzte Exon der TR1 zwischen den loxP-Erkennungsstellen herausgeschnitten werden

#### 4.1.3 Klonierung des *Gene Targeting* - Vektors pCJ7

Ziel der Klonierung war es, das in

Abbildung 7 dargestellte *Gene Targeting* - Konstrukt als Bakterienplasmid herzustellen. Das partiell sequenzierte Cosmid MPMGc121Io7462Q2 wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Insgesamt sieben verschiedene Plasmide wurden nacheinander kloniert, bis der *Gene Targeting* - Vektor pCJ7 hergestellt worden war.

Zunächst wurde aus dem Cosmidklon ein 1339 bp großes Fragment durch Restriktionsverdau mit *XmaI* und *EcoRV* isoliert und dieser in den Vektor pBluescript SK+, der mit den selben Restriktionsenzymen linearisiert worden war, eingesetzt (pCJ1). Daraufhin konnte der rechte Arm mit *Sall/BamHI* aus pCJ1 isoliert und in den *Gene Targeting* - Vektor pPNT4 (Abb. 1 im Kapitel Material), welcher zuvor mit *BamHI* und *XhoI* linearisiert worden war, eingesetzt werden (pCJ2). Parallel dazu wurde der linke Arm wie folgt sukzessiv in mehreren Schritten zusammengefügt. Durch Verdau mit *HindIII* konnte aus dem Cosmid ein Fragment von 6670bp isoliert und in pBluescript SK+ eingefügt werden (pCJ3). Aus pCJ3 wurde der linke Arm durch Verdau mit *HindIII* und *XmaI* isoliert und in den mit diesen beiden linearisierten pBluescript SK+ Vektor eingesetzt (pCJ4). pCJ4 wurde mit *XmaI* linearisiert und ein sogenannter „linker“ eingesetzt. Dabei handelte es sich um ein Oligonukleotid, das neben der 34bp langen loxP Sequenz die Restriktionserkennungsstellen für *EcoRI*, *AseI* und *EcoRV* einfügte und gleichzeitig eine *XmaI* Stelle entartete (pCJ4+L). Der etwa 4,5 kBp große Bereich, der das Exon 16 enthält, wurde über *XmaI* aus dem Cosmid Klon isoliert und in den mit *XmaI* linearisierten pCJ4+L eingefügt (pCJ6). pCJ6 wurde mit *XhoI* und *NotI* geschnitten und das dabei entstandene Fragment von 10436 bp Größe in den mit *NotI* und *Sall* linearisierten pCJ2 eingefügt (pCJ7). In Abbildung 8 ist das vollständige *Gene Targeting* - Konstrukt pCJ7 dargestellt.



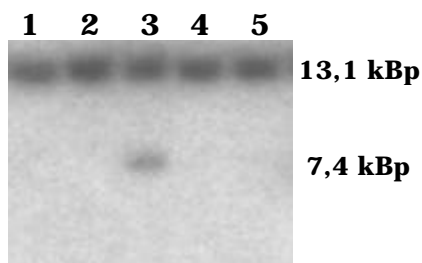
#### **Abbildung 8: Gene Targeting - Vektor pCJ7**

Die für die Verifizierung der homologen Rekombination notwendigen, charakteristischen Restriktionsschnittstellen *AseI*, *EcoRV* und *EcoRI* befinden sich im Intronbereich zwischen Exons 15 und Exon 16. Direkt an die 3'-*loxP*-Stelle schließt sich eine von *frt*-Erkennungsstellen flankierte Neomycin-Kassette (*neo*) an. Das Thymidinkinase-Resistenzgen (*TK*) befindet sich zwischen dem rechten homologen Arm des *Gene Targeting* - Konstruktes und dem pBluescript SK+-Rückgrat (pBlue).

#### 4.1.4 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Das klonierte *Gene Targeting* - Konstrukt in Form des Plasmids pCJ7 wurde nach Linearisierung mit *NdeI* zur Transfektion von embryonalen Stammzellen der Maus verwendet. Die verwendete ES-Zelllinie E14 stammt

aus Blastozysten einer 129/ola Maus und hatte sich zuvor innerhalb der Arbeitsgruppe zur Etablierung von Selenoprotein-Knock-out-Mauslinien hinsichtlich homologer Rekombination in ES-Zellen und Keimbahntransmission der veränderten Allele besonders gut bewährt. Nach Elektroporation des *Gene Targeting* - Konstruktes pCJ7 wurden ES-Einzelzellklone selektioniert. Die einzelnen ES-Zellklone wurden mittels Southern Blot hinsichtlich homologer Rekombination getestet. Die selektionierten ES-Zellklone wurden zunächst mit der 5'-DNA-Sonde, die außerhalb des linken homologen Arms bindet, getestet. Die homolog rekombinierten ES-Zellklone konnten von den Wildtyp-Klonen dadurch unterschieden werden, dass zusammen mit der linken loxP Erkennungsstelle eine zusätzliche *EcoRV* Restriktionsstelle in die homolog rekombinierten ES-Zellklone eingeführt worden war. Durch Restriktionsverdau mit *EcoRV* entstehen so bei homolog rekombinierten ES-Zellklonen DNA-Fragmente mit einer Größe von 7,4 kBp im Gegensatz zu 13,1 kBp, was dem Wildtyp-Allel entspricht (siehe Abbildung 9).



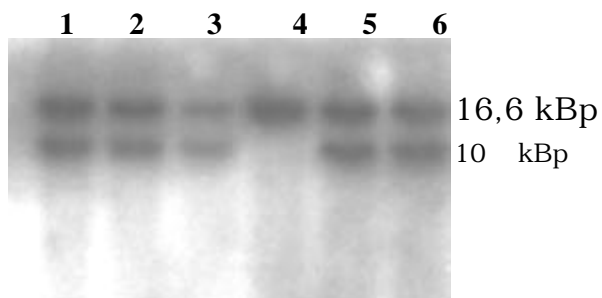
**Abbildung 9: Southern Blot mit linker DNA-Sonde**

Nach Restriktionsverdau der ES-Zellklone mit *EcoRV* und Hybridisierung mit der 5'-DNA-Sonde entsteht neben der Wildtyp-Bande mit 13,1, kBp bei Zellklon 3 auch eine 7,4 kBp große Bande, die die homologe Rekombination dieses ES-Zellklons anzeigt.

Zur Verifizierung der homologen Rekombination wurden sechs, mit der linken DNA-Sonde als homolog rekombiniert identifizierte ES-Zellklone ausgewählt und zusätzlich mit der rechten DNA-Sonde, die außerhalb des



rechten homologen Arms bindet, in einem *AseI*-Restriktionsverdau und Southern Blot getestet (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Southern Blot mit rechter DNA-Sonde**

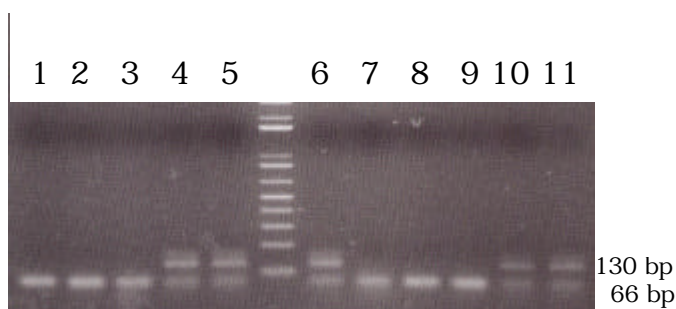
Bei fünf von sechs zuvor durch die linke DNA-Sonde als homolog rekombiniert identifizierten ES-Zellklonen konnte die homologe Rekombination des *Gene Targeting* - Konstruktes mit der rechten DNA-Sonde bestätigt werden.

Um illegitime, zusätzliche Integration des *Gene Targeting* - Konstruktes in andere Bereiche des Genoms der ES-Zellen ausschließen zu können, wurden die ES-Zellklone mit *EcoRI* verdaut und einer DNA-Sonde getestet, die Teile des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase (Neomycin-Kassette) spezifisch bindet. Die Mehrfachintegration des *Gene Targeting* - Konstruktes kann ausgeschlossen werden, wenn die Neomycin-DNA-Sonde nur eine deutliche Bande anzeigt, was bei allen 5 ES-Zellklonen der Fall war (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnten somit von 288 getesteten ES-Zellklonen fünf positiv homolog rekombinierte Klone identifiziert werden. Diese fünf ES-Zellklone wurden expandiert und nach der Expansion nochmals mit allen drei DNA-Sonden mittels Southern Blot verifiziert. Dann wurden die ES-Zellen in mehreren Aliquots eingefroren und bis zur Blastozysteninjektion in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

#### 4.1.5 Chimärenherstellung und Rückkreuzung der Chimären

Die Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozysten erfolgte im Labor von W. Wurst, Institut für Entwicklungsgenetik der GSF, Neuherberg. Die homolog rekombinierten ES-Zellen des Klons TR1-5 wurden in Blastozysten injiziert, die von C57BL/6-Inzuchtmäusen gewonnen wurden. Die injizierten Blastozysten wurden mittels Embryotransfer in scheinträchtige, synchronisierte CD1 Empfängerweibchen implantiert. Es wurde ein männliches, chimäres Tier geboren, das an dem gescheckten Haarkleid zu erkennen war. Etwa 70% des schwarzen Haarkleides stammte von der C57BL/6-Blastozyste ab, wohingegen die restlichen 30% der Haare bräunliche Haarfarbe abstammend von 129/ola aufwiesen.

Dieses chimäre Tier wurde im Alter von sechs Wochen mit mehreren C57BL/6-Weibchen verpaart. Etwa 50% Prozent der Nachkommen aus diesen Verpaarungen hatten ein braunes Fell, Indiz dafür, dass die injizierten ES-Zellen funktionelle Spermien bilden konnten. Ob die Tiere mit brauner Fellfarbe auch das gewünschte konditionale, d.h. homolog rekombinierte TR1-Allel aufwiesen, konnte mittels PCR von Schwanzspitzen-DNA untersucht werden (siehe Abbildung 11). Von 42 braunen Tieren wiesen 17 Tiere die erwünschte genetische Veränderung auf, d.h. damit konnte die Keimbahntransmission des konditionalen TR1-Allels verifiziert werden.



**Abbildung 11: PCR Analyse von braunen Nachkommen aus der Verpaarung der Chimäre mit C57BL/6**

DNA von Tieren mit dem konditionalen TR1-Allel ergibt bei der PCR-Analyse neben dem kürzeren Wildtyp-Produkt (66Bp) auch ein längeres Produkt (130 Bp). In 1,2,3,7,8,9 handelt es sich um  $TR1^{wt/wt}$  Tiere, hingegen bei 4,5,6,10,11 um  $TR1^{lox/wt}$ -Mäuse.

Nach dem verwendeten ES-Zellklon TR1-5 wurde der konditionale TR1-Knock-out-Mausstamm „Fünf“ benannt. Fortan wurden die Tiere dieses Stammes entweder mit C57BL/6 oder untereinander verpaart. Sowohl die heterozygoten TR1<sup>flox/wt</sup> Tiere, als auch die homozygoten TR1<sup>flox/flox</sup> Tiere waren lebensfähig und zeigten bislang bis zum Alter von 12 Monaten keine klinisch beobachtbare Veränderung des phänotypischen Erscheinungsbildes.

#### 4.1.6 Etablierung von TR1-Knock-out-Mäusen

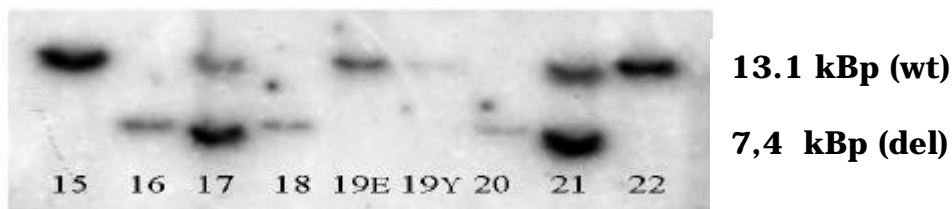
Um das konditionale TR1-Allel zunächst ubiquitär in allen Geweben zu inaktivieren, wurde das chimäre Tier mit Deleter-Cre-Weibchen verpaart. Von insgesamt 26 Nachkommen hatten 6 Tiere (23%) den Genotyp TR1<sup>wt/del</sup>, Deleter-Cre positiv. Bei diesen sechs Tieren war durch die Expression der Cre-Rekombinase auf einem Allel der Abschnitt des TR1-Gens zwischen den loxP-Stellen weitgehend deletiert („del“) worden. Heterozygote TR1<sup>wt/del</sup> Tiere zeigten bislang keine beobachtbaren klinischen Auffälligkeiten (ältestes Tier zur Zeit: 12 Monate). Die TR1<sup>wt/del</sup> Tiere wurden untereinander verpaart, um in der F2 Generation TR1<sup>del/del</sup> Tiere zu erhalten. andererseits wurden TR1<sup>wt/del</sup> Tiere mit C57BL/6 verpaart, um den TR1-Knock-out Stamm auf diesen Inzuchtstamm rückzukreuzen.

#### 4.1.7 Phänotyp der TR1-Knock-out-Embryonen

Aus der Geschwisterverpaarung TR1<sup>wt/del</sup> x TR1<sup>wt/del</sup> wurde unter 78 genotypisierten Nachkommen kein einziges TR1<sup>del/del</sup> Tier geboren. Daher entstand die Hypothese, dass der homozygote TR1-Knock-out nicht mit einer Entwicklung bis zur Geburt vereinbar ist. Um zu bestimmen, an welchem Tag der Embryonalentwicklung die TR1<sup>del/del</sup> Embryonen sterben, wurden heterozygote Tiere miteinander verpaart und täglich auf einen Vaginalplug kontrolliert. Am neunten und zehnten Tag p.c. wurden die Muttertiere euthanasiert und der Uterus entnommen. Die Embryonen wurden einzeln unter dem Stereomikroskop präpariert und fotografiert. Anschließend

wurden die Embryonen komplett lysiert und der Genotyp mittels Southern Blot bestimmt.

Die Embryonen wurden am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung bei 6-facher Vergrößerung betrachtet. Die Plazentome aller Wurfgeschwister erschienen äußerlich unauffällig. Nach Öffnen der Plazentome zeigte sich, dass einige der Embryonen (16, 18, 20) kleiner und missgebildet waren. Hingegen erschienen die Embryonen 15, 17, 19, 21 und 22 gut entwickelt. Die Genotypisierung mittels Southern Blot ergab, dass die Embryonen 16, 18 und 20 homozygote TR1-Knock-out Embryonen waren (siehe Abbildung 12).



#### **Abbildung 12: Southern Blot der Embryonen Tag 9.5**

Die DNA von am Tag E9.5 freipräparierten Embryonen aus einer Verpaarung zweier TR1<sup>wt/del</sup> Mäuse wurde mittels Southern Blot analysiert. Bei den Embryonen 16, 18 und 20 handelt es sich um TR1<sup>del/del</sup> Tiere, 15, 19 und 22 waren TR1<sup>wt/wt</sup> und die Tiere 17 und 21 zeigten sowohl die längere wt-Bande als auch die kürzere del-Bande und waren somit TR1<sup>wt/del</sup>. Bei Tier 19 wurde sowohl die DNA des Embryos direkt (E), als auch die DNA des Dottersacks (Y) analysiert, bei allen anderen Embryonen handelte es sich ausschließlich um DNA, die aus dem Embryo gewonnen wurde.

Bei der Präparation mehrerer Uteri am Tag 10.5 der Embryonalentwicklung erschienen bereits vor Öffnen der Uteruswand einige der Plazentome kleiner und dunkelrot bis schwärzlich verfärbt. Aus diesen bereits in Resorption befindlichen Plazentomen konnten keine Embryonen mehr isoliert werden und dementsprechend auch der Genotyp dieser Embryonen nicht bestimmt werden. Am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung dagegen zeigte keines der Wurfgeschwister auffällige Entwicklungsstörungen. Somit konnten bis zu diesem Entwicklungsstadium keine Unterschiede zwischen Knock-out- und Wildtyp-Embryonen festgestellt werden. Daher kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass die Embryonalentwicklung der Maus ohne eine funktionelle TR1 bis zum Tag 8.5 ungestört verläuft, am Tag 9.0 gestört ist

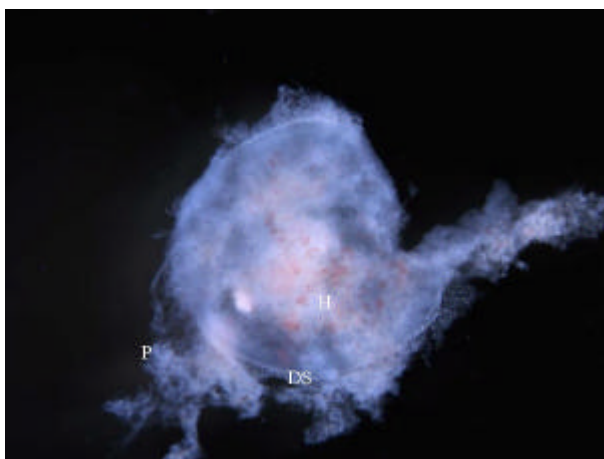
und am Tag 10.5 die Embryonen bereits derart mißgebildet sind, dass eine weitere Embryonalentwicklung nicht möglich ist.

Im Folgenden soll nun die Morphologie von TR1-Knock-out-Embryonen im Vergleich zu gut entwickelten Geschwistern am Tag 9.5 genauer beschrieben werden. Die Embryonen mit den Nummern 40-53 stammten alle aus einem Wurf. Nach der Präparation aus dem Uterus wurden sie jeweils mit und ohne Embryonalhüllen, d.h. Dottersack und Amnion fotografiert und anschließend für die Genotypisierung lysiert.



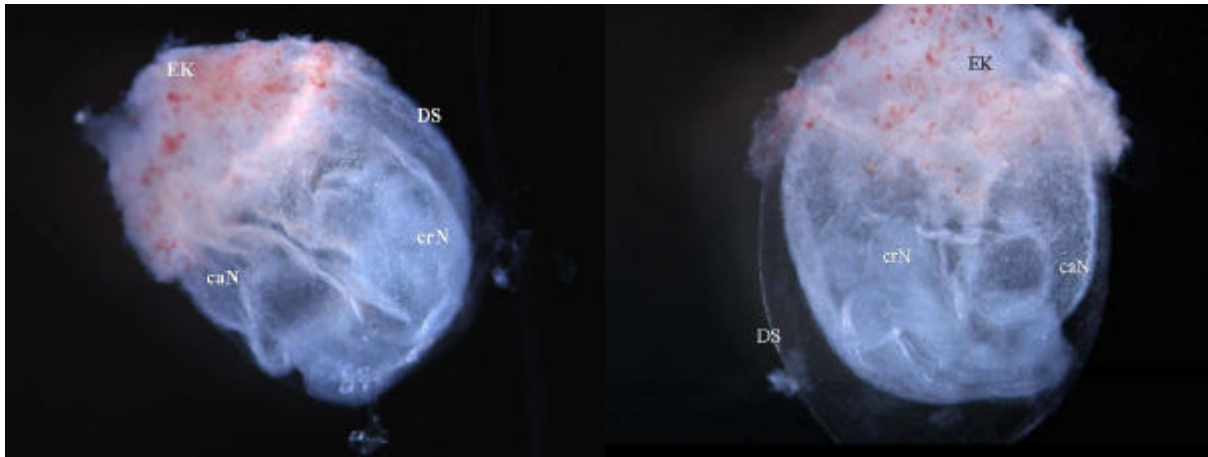
**Abbildung 13: Embryo 44 TR1<sup>wt/del</sup>**

Der vom Dottersack (DS) umhüllte Embryo 44 befindet sich am Embryonaltag E9.5 und ist gut entwickelt. Alle für dieses Stadium typischen Strukturen sind gut zu erkennen, z.B. die Herzanlage (HA) und das optische Vesikel (OV).



**Abbildung 14: Embryo 40 TR1<sup>del/del</sup>**

Der Dottersack (DS) des TR1-Knock-out Embryos 40 ist deutlich kleiner als die der gut entwickelten Wurfgeschwister. Die Oberfläche des Dottersacks aufgerauht, teils durch oberflächliche Hämorrhagien (H) mit Blutgefäßeinsprossungen, teils durch Verwachsungen mit Plazentagewebe (P).



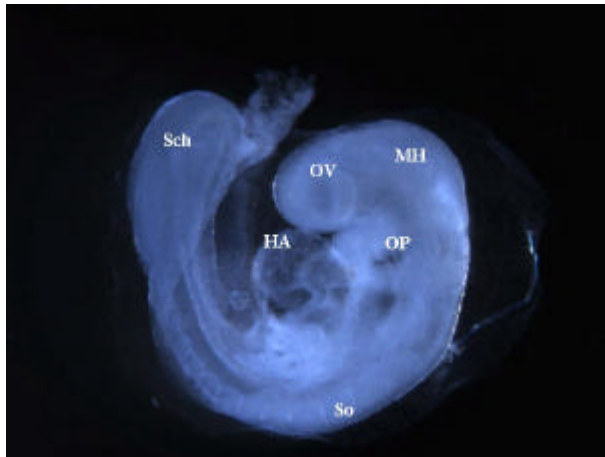
**Abbildung 15: Embryo 50  $TR1^{del/del}$ , verschiedene Seitenansichten**

Der Embryo 50 befindet sich im Dottersack (DS) und ist vom ekto-plazentalen Konus (EK) überdacht. Das craniale Ende (crN) und caudale Ende (caN) des embryonalen Körpers sind lokalisierbar.



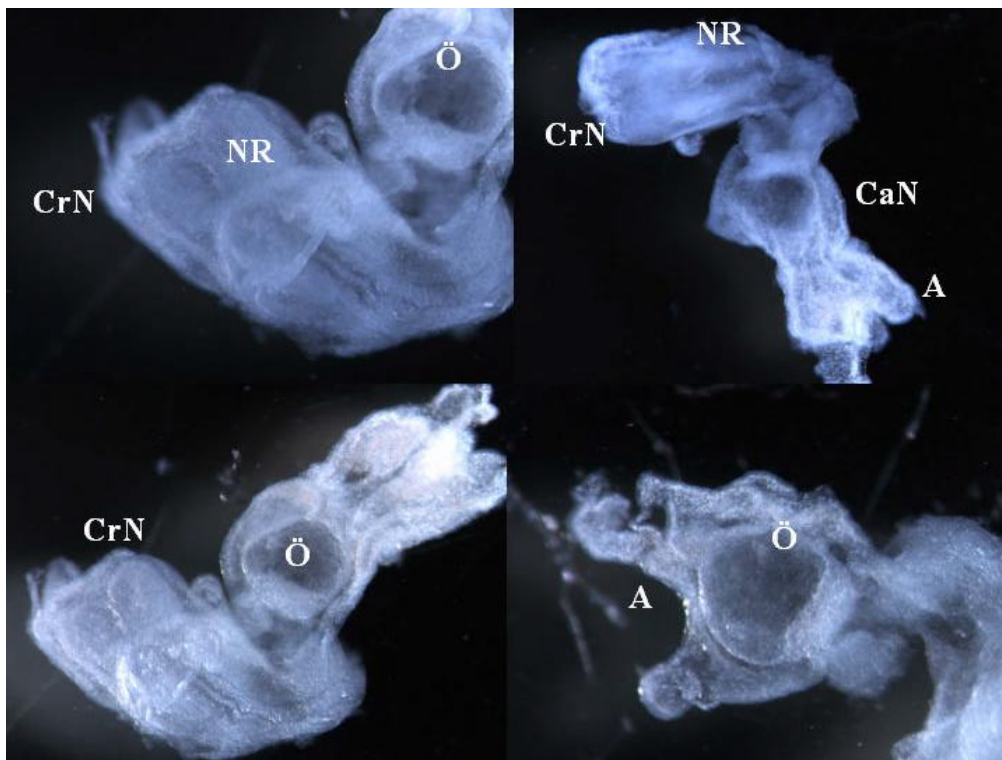
**Abbildung 16: Embryo 49  $TR1^{wt/wt}$**

Der Wildtyp-Embryo 49 ist gut entwickelt und entspricht dem Stadium E9.5. Während der Präparation wurde der Schwanz verdreht.



**Abbildung 17: Embryo 47 TR1<sup>wt/wt</sup>**

Der Wildtyp-Embryo 47 befindet sich am Tag E9.5 der Entwicklung. Der Schluss des Neuralrohrs ist vollzogen, es sind bereits etwa 12 Somiten (So) ausgebildet. Das Optische Vesikel (OV), die Ohrplakode (OP), das Mittelhirn (MH), die Herzanlage (HA) und der Schwanz (Sch) sind gut erkennbar.

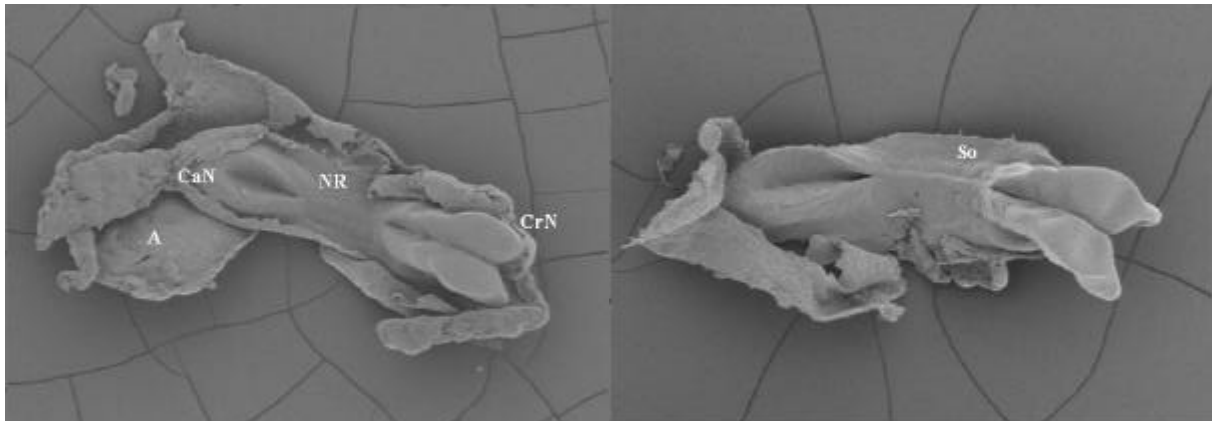


**Abbildung 18: Embryo 50 TR1<sup>del/del</sup> verschiedene Seitenansichten**

Der TR1-Knock-out-Embryo 50 zeigt eine blasenartige „Öffnung“ (Ö) am caudalen Ende des Körpers (caN), an der Teile des Amnions (A) verwachsen sind. Die Neuralwülste (NR) erscheinen am cranialen Ende des Körpers (CrN) paarig, sie sind nicht zu einem Rohr verschlossen. Es ist keine Segmentation oder Somitenbildung zu erkennen.

Der TR1-Knock-out-Embryo 40 zeigte starke Missbildungen und Verwachsungen des Dottersacks mit Plazentagewebe und konnte sich höchstens auf einem mit Tag 7.0 der Embryonalentwicklung vergleichbaren Differenzierungsstatus („primitive streak“) befinden. Die Hämorrhagien auf der Oberfläche des Dottersackes deuten auf eine beginnende Resorption hin. Ebenso wie Embryo 40 zeigte der TR1-Knock-out-Embryo 50 Missbildungen. Der Embryo 50 befand sich höchstens in einem Entwicklungsstadium, der mit dem Tag E8.5 normal entwickelter Embryonen zu vergleichen wäre. Allerdings wäre dann mindestens ein Anzahl von 6 Somitenpaaren zu erwarten. Diese jedoch fehlten vollständig. Der Schluss des Neuralrohrs ist am cranialen Pol nicht vollzogen (vgl. Abbildung 15, links), da die noch paarig angelegten, schlittenkufenartig geformten Neuralwülste zu erkennen sind. Caudal befindet sich eine blasig aufgetriebene „Öffnung“, bei der es sich vermutlich um eine vergrößerte Allantoisblase handelt. Es konnte bei der Präparation mehrerer Würfe immer wieder beobachtet werden, dass innerhalb eines Wurfes Entwicklungsstadien von Embryonen zu finden waren, die um bis zu 48 h voneinander differierten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein Fehlen einer funktionellen TR1 mit massiven Proliferations- und Differenzierungsstörungen verbunden ist. Da der Knock-out-Embryo 50 im Vergleich zu seinen gut entwickelten Geschwistern in der Entwicklung um mindestens 24 h retardiert war, erschien ein Vergleich dieses Knock-out-Embryos mit Wildtyp-Embryonen vom Tag 8.5 der Embryonalentwicklung sinnvoll. Für die vergleichende Analyse wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von C57BL/6-Embryonen von U. Heinzmann, GSF Institut für Pathologie, zur Verfügung gestellt.





**Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von C57BL/6-Embryonen am Tag 8.0 der Embryonalentwicklung**

Am Tag 8.0 der Embryonalentwicklung beginnt sich das Neuralrohr (NR) ausgehend von der Zervikalregion zum cranialen (CrN) und caudalen Pol (CaN) hin zu schließen. Beim Embryo im rechten Bild sind bereits 4 Somiten (So) zu erkennen.

Um die Missbildungen des Embryo 50 besser beurteilen zu können, wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Kriterien zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums des Mausembryos am Tag E8.0 herangezogen.

---

Definition E8.0 der Embryonalentwicklung der Maus

---

- Beginn der Somitenentwicklung, 1-4 Somiten
  - Embryonale Drehung noch nicht vollzogen
  - Allantois dehnt sich in das Exocoelom aus
  - Maxillärer Anteil des 1. Kiemenbogens prominent
  - Kopfdarmtasche sichtbar
- 

**Tabelle 11: Kriterien zur Bestimmung des Embryonalstadiums**

Quelle: „The Edinburgh Mouse Atlas, Volume 1, Version 1.24, 2002”  
(<http://genex.hgu.mrc.ac.uk>.)

Der Vergleich der TR1-Knock-out-Embryonen mit Wildtyp-Embryonen am Tag E8.5 der Entwicklung zeigte, dass die TR1-Knock-out-Embryonen nicht nur in ihrer Entwicklung retardiert, sondern auch missgebildet waren. Dies wurde insbesondere durch das Fehlen der Somitogenese und die caudal gelegene aufgetriebene Allantoisblase deutlich. Weitere äußere Betrachtungen der TR1-Knock-out-Embryonen mit Hilfe des

Rasterelektronenmikroskops sind geplant und sollen helfen, die Art der Missbildungen besser zu definieren.

#### 4.1.8 Histologische Analyse der TR1-Knock-out-Embryonen

Zur histologischen Analyse der TR1-Embryonen wurden Uteri an Tag 8.5 und 9.5 der Embryonalentwicklung komplett entnommen und in Stücke mit jeweils 3-4 Plazentomen geschnitten. Pro Uterus wurden etwa 200 Paraffinschnitte in Serien angefertigt, um sicher zu sein, dass jeder Embryo bei der histologischen Untersuchung vollständig erfasst werden konnte. Gemäß der Mendel'schen Vererbungslehre sollten bei einer Verpaarung von zwei heterozygoten  $TR1^{wt/del}$  Elterntieren 25% der Nachkommen den Genotyp  $TR1^{del/del}$  aufweisen, d.h. statistisch gesehen sollte ein Uterus mit acht Embryonen zwei Embryonen enthalten, die den Genotyp  $TR1^{del/del}$  aufweisen. Bei der direkten Betrachtung der histologischen Präparate am Tag E9.5 mit freiem Auge konnten die Plazentome bereits auf das Vorhandensein einer Dottersackhöhle und eines Embryos überprüft werden (vgl. Abbildung 20). Durch Färbung und Analyse jedes vierten histologischen Präparates des in Serie geschnittenen Uterus „ÜDa 73“ zeigte sich, dass zwei von sieben Plazentomen morphologisch auffällig waren. Dies wurde ersichtlich durch die kleinere Dottersackhöhle und kleinere Größe der darin befindlichen Embryonen (siehe Tabelle 12).

Objekttr.⇒ Plazentom ↓	16 E	16 H	23 E	23 H	31 E	31 H	38 E	38 H	46 E	46 H	53 E	53 H	61 E	61 H
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
4	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
5	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
7	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	?	✓

Objekttr.⇒ Plazentom ↓	68 E	68 H	76 E	76 H	83 E	83 H	91 E	91 H	98 E	98 H
1	-	✓	-	✓	-	✓	-	-	-	-
2	✓	✓	-	✓	-	✓	-	-	-	-
3	?	✓	?	✓	?	✓	-	-	-	-
4	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓
6	-	✓	-	✓	-	-	-	-	-	-
7	?	✓	?	✓	-	-	-	-	-	-

Erklärungen:

E : Embryo

H :

Dottersackhöhle

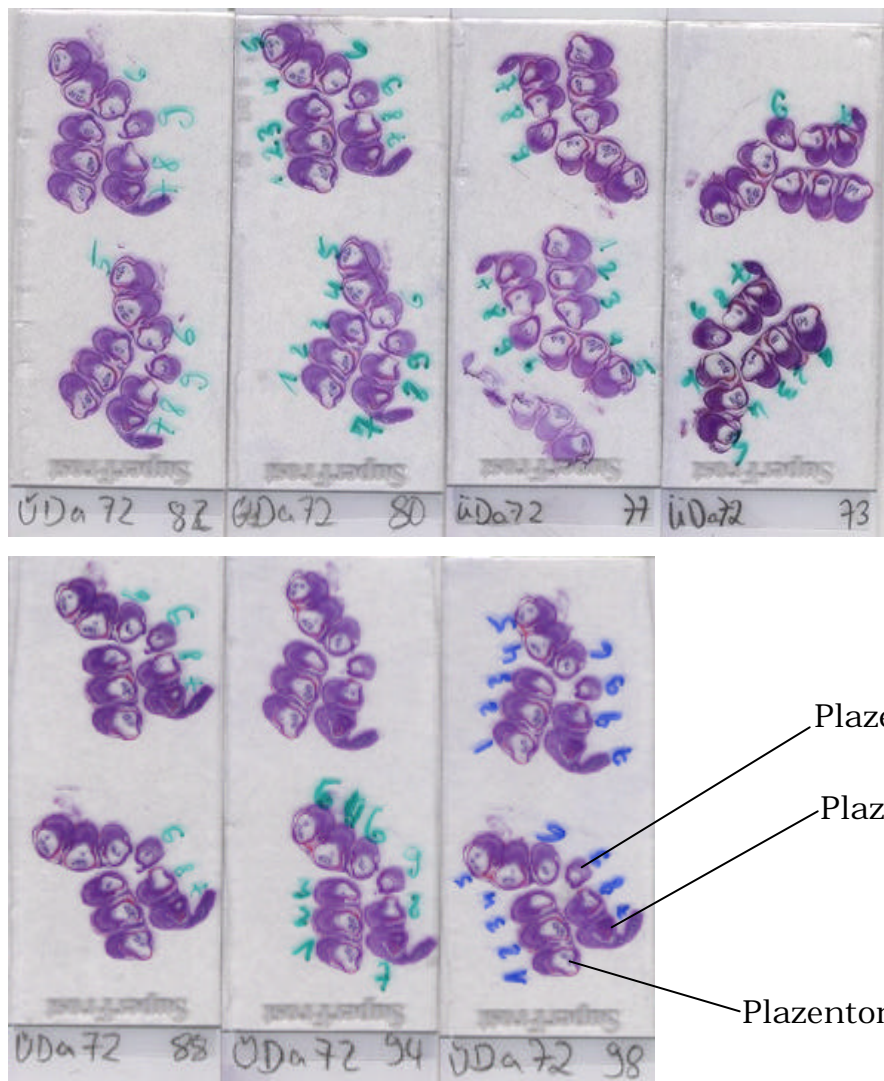
- : Nicht

vorhanden

✓ : Vorhanden

**Tabelle 12: Analyse der histologischen Präparate des Uterus ÜDa 73**

Auch bei der histologischen Analyse des Uterus ÜDa 72 mit insgesamt neun Embryonen am Tag E9.5 fielen wiederum zwei Plazentome mit den Nummern 7 und 9 auf, da sie zum einen kleiner als die anderen waren und zum anderen die Dottersackhöhle im Plazentom 7 teilweise mit Blut gefüllt war (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Makroskopische Betrachtung der histologischen Präparate des Uterus ÜDa 72 am Tag E9.5 der Embryonalentwicklung**

Der Uterus ÜDa72 mit insgesamt 9 Wurfgeschwistern wurde am Tag E9.5 entnommen, komplett fixiert, paraffinisiert und in Serie geschnitten. Etwa jeder vierte Objektträger wurde HE-gefärbt und mit freiem Auge betrachtet. Die Plazentome 7 und 9 fielen durch die kleinere Größe und im Besonderen das Plazentom 7 durch die blutgefüllte Dottersackhöhle auf.

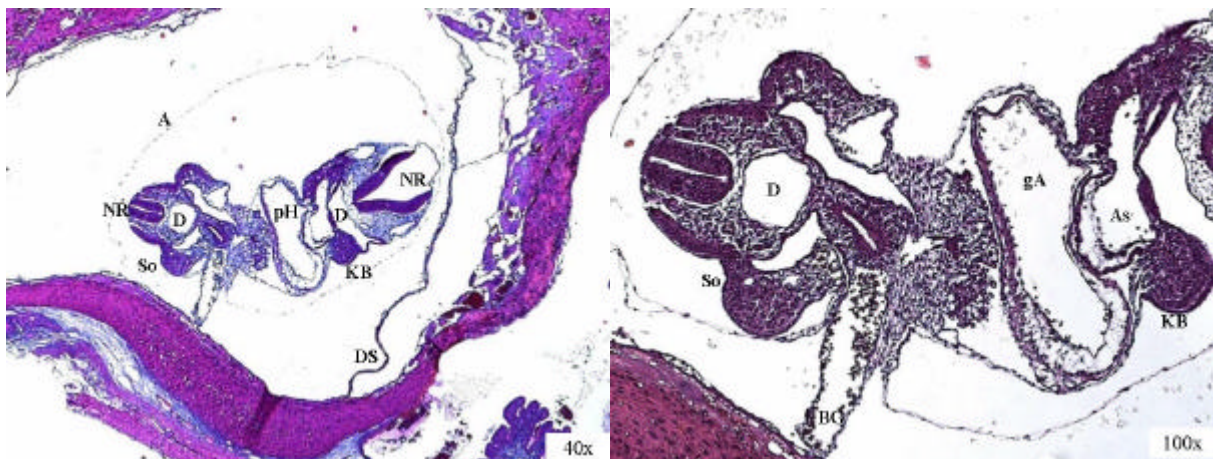
Wie bei dem Uterus ÜDa 73 kann vermutet werden, dass es sich bei den auffälligen Plazentomen um TR1-Knock-out-Embryonen handelt.

Die auffälligen Plazentome wurden mit gut entwickelten Geschwistern lichtmikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung verglichen. Im Nachfolgenden werden zunächst histologische Merkmale eines gut entwickelten Embryos (E9.5) am Beispiel des Plazentoms 1 aus dem Uterus ÜDa72 beschrieben.



**Abbildung 21: Plazentom 1 aus Uterus ÜDa 72**

Der Embryo befindet sich im Entwicklungsstadium E9.5. Das Neuralrohr (NR) ist auf diesem Präparat bereits geschlossen, eine primitive Herzanlage (pH), Kiemenbogenanlagen (KB) und Somiten (So) sind vorhanden. (A: Amnion, DS: Dottersack)



**Abbildung 22: Plazentom 1 aus Uterus ÜDa 72**

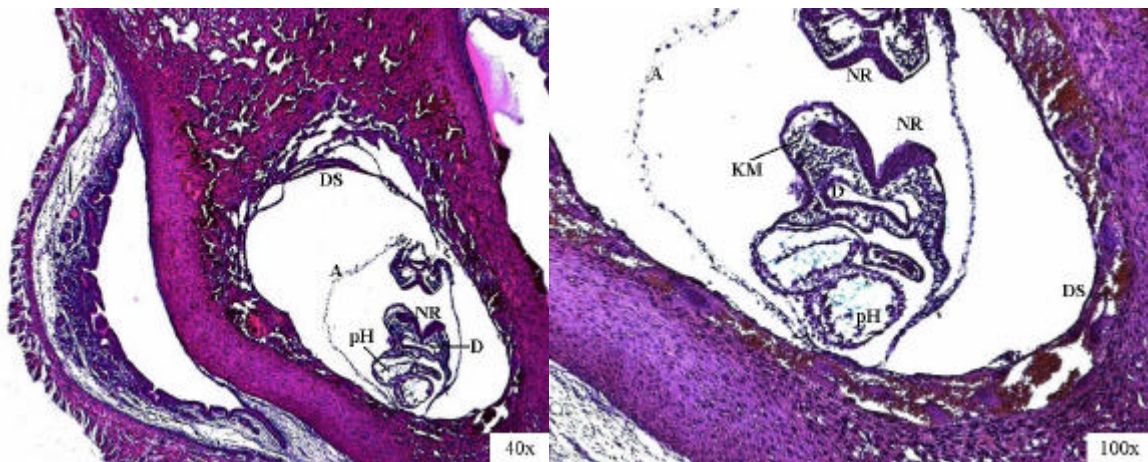
Es handelt sich um denselben Embryo wie in Abbildung 21. In dieser Schnittebene zeigt sich, dass das Neuralrohr (NR) am cranialen Pol noch nicht vollständig geschlossen ist. Die Organogenese von Kiemenbogen (KB), primitivem Herz (pH), Darmtrakt (D) entspricht dem Stadium des Embryonaltags E9.5. In der gemeinsamen atrialen Kammer (gA), im Aortensack (As) und einem großen Blutgefäß (BG) sind Blutzellen erkennbar. Eine deutliche Somitenformung (So) ist zu erkennen.

Bei Embryo 1 in Uterus ÜDa72 handelt es sich um einen gut entwickelten Embryo im Entwicklungsstadium E9.5. In diesem Stadium sind etwa 13-20 Somitenpaare vorhanden. Die bei Mäusen typischerweise am Tag 8,5-9.0 stattfindende Drehung des Embryos, bei der Ektoderm nach außen und



Endoderm nach innen gestülpt wird, ist bereits vollzogen, d.h. ektodermale Strukturen, wie z.B. das Neuroepithel sind an die Außenfläche des Embryos gerichtet. Der Schluss des Neuralrohrs ist bis auf den kranialen Bereich weitgehend vollzogen, wodurch ein kranialer Neuroporus entsteht. Eine primitive Herzanlage mit einer gemeinsamen Atrialkammer, Aortensack und dorsaler Aorta sind ebenso wie ein primitiver Darm und Kiemenbogenanlagen bereits ausgebildet.

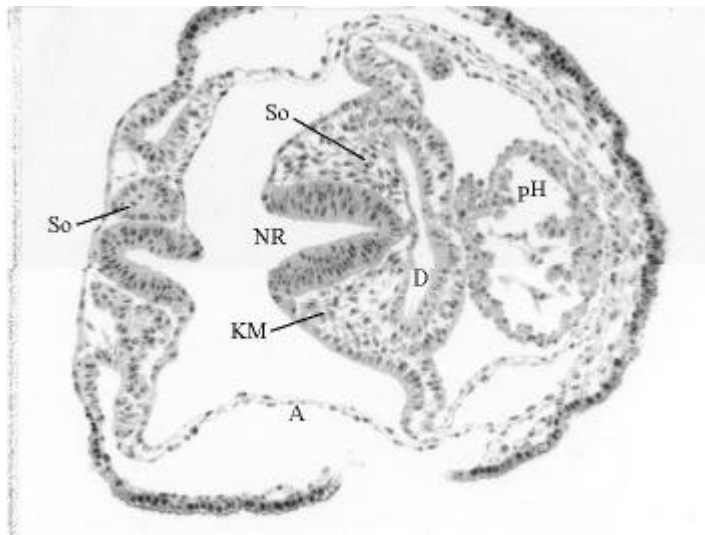
Vergleicht man dazu den Embryo 7 in Uterus ÜDa72, so befindet sich dieser höchstens am Tag 8.0 der Embryonalentwicklung, was dadurch erkennbar ist, dass die Invertierung des Embryo noch nicht erfolgt ist und somit das ektodermale Neuroepithel ins Innere des Amnions gerichtet ist (Abbildung 23). Das Neuroepithel des Kopfbereich ist stark verdichtet. Im Bereich des Kopfmesenchyms (KM) befindet sich eine stark verdichtete Zellmasse, die mit dem Neuroepithel in Berührung steht und deren Herkunft unbekannt ist.



**Abbildung 23: Plazentom 7 aus Uterus ÜDa 72**

Dieser Embryo ist etwa nur halb so groß wie der in Plazentom 1. Das Neuralrohr (NR) ist nicht geschlossen und die Drehung des Embryos hat noch nicht begonnen. Eine primitive Herzanlage (pH) und Darmlumen (D) sind erkennbar. Das Kopfmesenchym (KM) fällt durch ungleichmäßige Strukturierung auf und zeigt eine verdichtete Zellmasse, die mit dem Epithel der Neuralrinne (NR) in Kontakt steht.

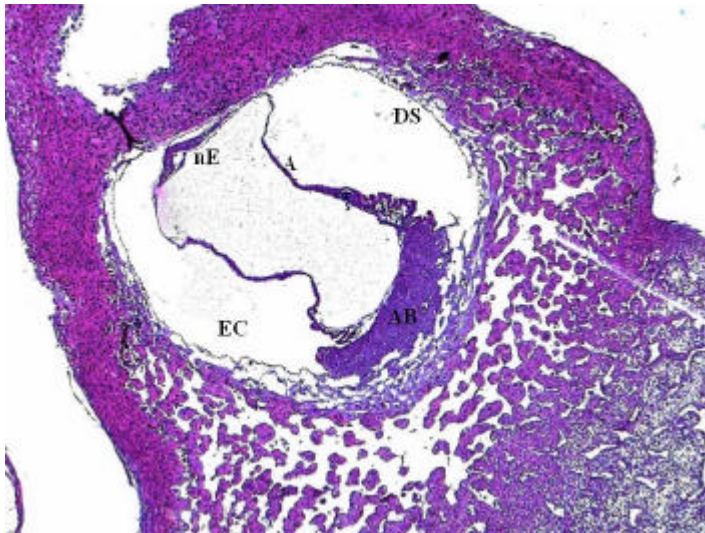
Die Störungen in der Gewebsdifferenzierung des Embryo 7 im Bereich des Kopfmesenchyms, des neuralen Epithels und die fehlende Somitogenese werden durch den Vergleich mit einem Wildtyp-Embryo in Abbildung 24 am Tag 8.5 deutlich.



**Abbildung 24: Wildtyp-Embryo am Tag 8.5 der Entwicklung**

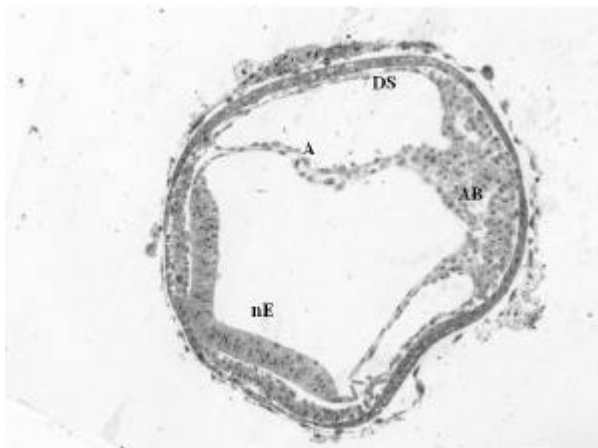
Die Öffnung der Neuralrinne (NR) ist ins Körperinnere gerichtet. In unmittelbarer Nachbarschaft zur Neuralrinne sind Somitenanlagen (So) ausgebildet. Das Kopfmesenenchym (Km), Darmlumen (D) und primitives Herz (pH) erscheinen gleichmäßig differenziert. Quelle: „The Edinburgh Mouse Atlas, Volume 1, Version 1.24, 2002“ (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk>.)

Bei Embryo 9 (siehe Abbildung 25) handelt es sich um einen Embryo, der sich höchstens in einem Stadium vergleichbar mit E7,5 der Embryonalentwicklung befindet. Im Vergleich zu einem Wildtyp-Embryo am Tag E7.5 (siehe Abbildung 26) erscheint die mesodermale Allantoisbasis des Embryos aus Plazentom 9 hyperplastisch, das neurale Ektoderm dagegen eher hypoplastisch.



**Abbildung 25: Plazentom 9 aus Uterus ÜDa 72**

Dieser Embryo scheint sich etwa im Stadium E7.5 zu befinden. Das Exocoelom (EC) wird von Dottersack (DS) und Amnion (A) begrenzt. Bei der relativ dicht und homogen basophil erscheinenden Zellmasse (AB) handelt es sich vermutlich um die mesodermale Allantoisbasis, gegenüber entwickelt sich das neurale Ektoderm (nE).

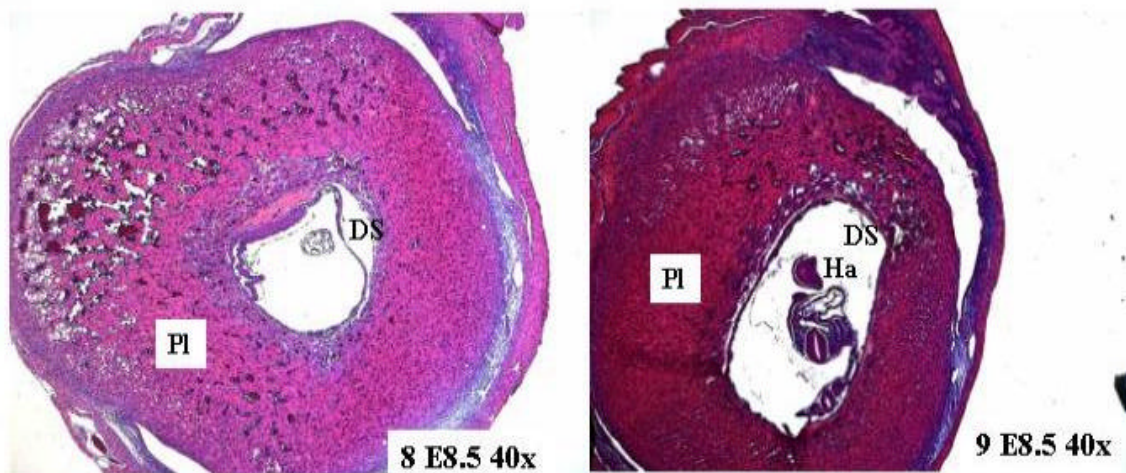


**Abbildung 26: Wildtyp-Embryo am Tag E7.5 der Entwicklung**

Dottersack (DS) und Amnion (A) begrenzen das Exocoelom, die mesodermale Allantoisbasis (AB) befindet sich gegenüber des neuralen Ektoderms (nE). Quelle: „The Edinburgh Mouse Atlas, Volume 1, Version 1.24, 2002” (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk>.)



Die mikroskopische Analyse eines Wurfes von Embryonen am Tag 8.5 der Entwicklung zeigte, dass sechs von insgesamt neun Embryonen die Merkmale eines am Tag E8.5 befindlichen Embryos zeigten, drei dagegen nur ein dem Tag E7.5 vergleichbares Entwicklungsstadium erreicht hatten. In Abbildung 27 ist ein solcher zurückgebliebener Embryo im Vergleich zu einem gut entwickelten Wurfgeschwister dargestellt.



**Abbildung 27: TR1-Knock-out-Plazentome am Tag E8.5 der Embryonalentwicklung**

Links im Bild handelt es sich um einen Embryo, der sich höchstens im Stadium E7.5 befindet, während ein gut entwickeltes Tier aus dem gleichen Wurf (rechtes Bild) bereits ein geschlossenes Neuralrohr, ein primitive Herzanlage (Ha) und Darmtrakt erkennen lässt. Die embryonale Drehung ist noch nicht vollzogen. Dieser Embryo befindet sich im Entwicklungsstadium E8.0. In der Ausbildung des placentaren Gewebes (Pl) ist dagegen kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Plazentomen erkennbar.

Zusammenfassend zeigten die histologischen Befunde der TR1-Knock-out-Embryonen, dass ein Fehlen einer funktionellen TR1 in Mausembryonen Wachstumsstörungen verursacht, die zu einer Retardation um bis zu 48 h führt. TR1-Knock-out-Embryonen, die das Embryonalstadium E8.5 erreichten, zeigten Differenzierungsstörungen in der Somitogenese, Malformationen in der Ausbildung des Kopfmesenchyms und des Neuroepithels der Neuralrinne.

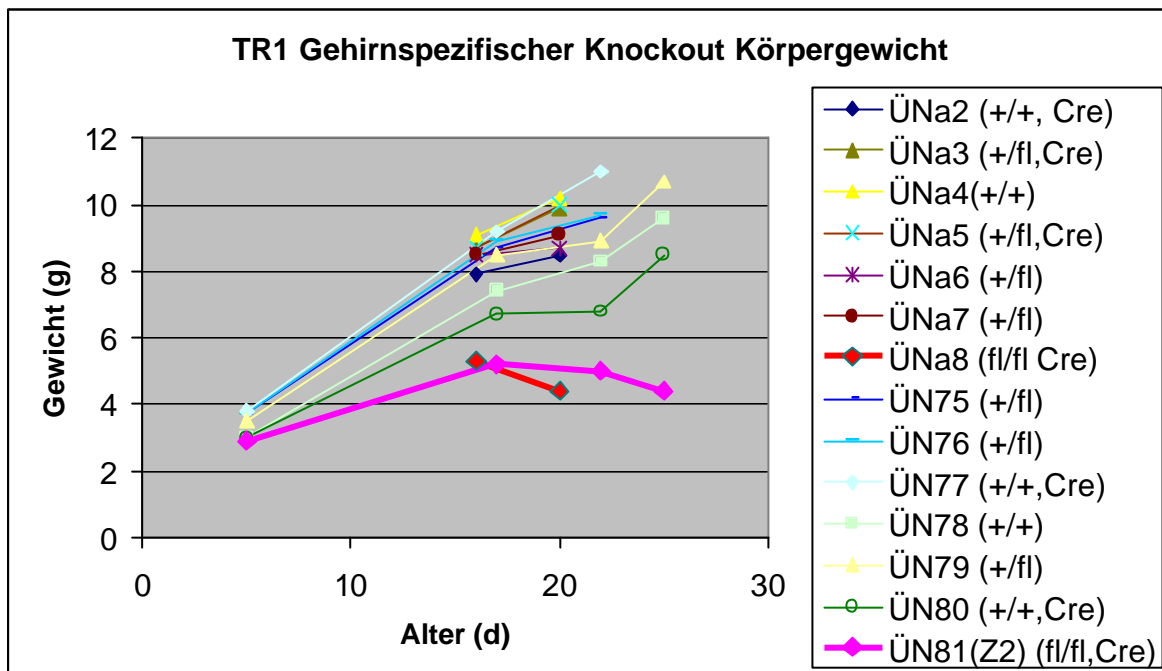
#### 4.1.9 Zucht und Analyse neuronenspezifischer TR1-Knock-out-Mäuse

Aufgrund der embryonalen Letalität von TR1-Knock-out-Mäusen war es nicht möglich postnatal Untersuchungen zur Funktion der TR1 in der Maus anzustellen. Deshalb sollte die *in vivo* Funktion der TR1 durch Zucht eines gewebsspezifischen Knock-outs untersucht werden. Dafür wurde der Nestin-Cre-transgene Mausstamm mit konditionalen TR1-Knock-out-Mäusen verpaart, um die TR1 nur in Nestin-exprimierenden, d.h. neuronalen Vorläuferzellen auszuschalten. Der Nestin-Cre-transgene Mausstamm enthält das Transgen für die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor (Tronche, Kellendonk et al. 1999), wodurch dieser Cre-transgene Mausstamm die Cre-Rekombinase nur in Nestin-exprimierenden, neuronalen Vorläuferzellen exprimiert. Die Beschränkung der Cre-Rekombinase Aktivität des Nestin-Cre-transgenen Mausstammes auf das Nervensystem konnte bei Untersuchungen von Knoepfler et al. bestätigt werden (Knoepfler, Cheng et al. 2002). Auf diese Weise sollte es möglich werden, die Funktion der TR1 in der Gehirnentwicklung studieren zu können.

Für die Zucht von gewebespezifischen Knock-out-Mäusen sind zwei Generationen erforderlich. In der ersten Generation wurden TR1<sup>wt/flox</sup> oder TR1<sup>flox/flox</sup> Tiere mit Nestin-Cre-transgenen Mäusen („Tg-Nes-Cre“) verpaart, um zunächst TR1<sup>wt/flox</sup> (Tg-Nes-Cre) Tiere zu erhalten. In der zweiten Generation wurden diese Tiere mit homozygoten TR1<sup>flox/flox</sup> -Tieren verpaart, wodurch statistisch 25% der Nachkommen den Genotyp TR1<sup>flox/flox</sup> (Tg-Nes-Cre) aufweisen sollten.

In der klinischen Beobachtung konnten die TR1<sup>flox/flox</sup> (Tg-Nes-Cre) Mäuse bereits ab dem Alter von etwa 10 Tagen post partum v.a. durch Störungen im Bewegungsablauf von ihren Wildtyp-Geschwistern unterschieden werden. Die Tiere zeigten Ataxien (zur Seite fallen und nur verzögerte Positionskorrektur) und intermittierendes Zittern. Im Alter von etwa 14 Tagen verloren sie an Körpergewicht und wirkten im Alter von etwa 19 Tagen apathisch. Der Tod der hochgradig kachektischen Tiere trat etwa im Alter von 3,5 bis 5 Wochen ein. Eine Gewichtskontrolle der ersten Nestin-Cre spezifischen TR1-Knock-out-Tiere zeigte, dass die TR1<sup>flox/flox</sup> (Tg-Nes-Cre) Tiere

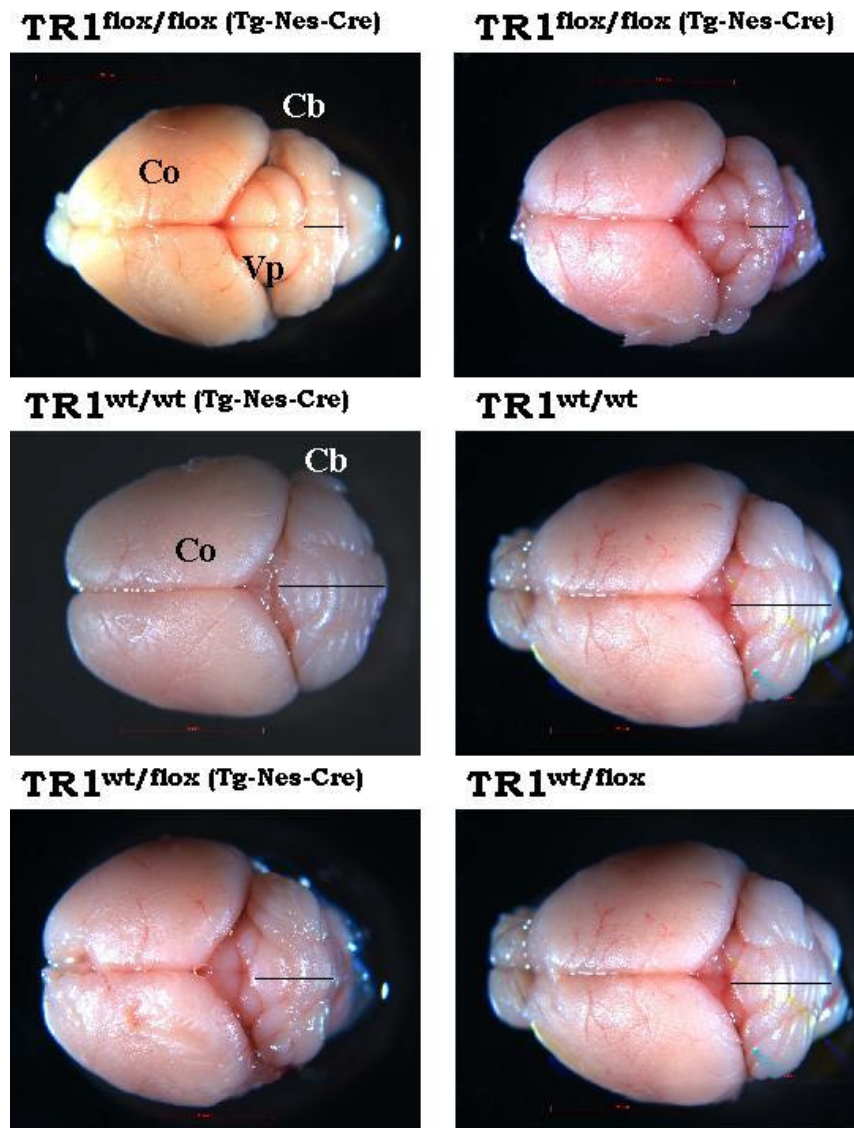
offenbar bis zum Alter von einer Woche im Körpergewicht ihren Wurfgeschwistern ähnelten, dann aber nicht mehr vergleichbar stark zunahmen.



**Tabelle 13: Gewichtsverlauf der TR1-gehirnspezifischen Knock-out-Mäuse**

Bei den Tieren ÜNa8 und ÜN81 handelte es sich um Nestin-Cre spezifische TR1-Knock-out Mäuse. Im Gegensatz zu allen anderen Genotypen zeigten diese beiden Tiere ab dem Alter von etwa 15 Tagen starken Gewichtsverlust.

Sechs Tiere aus einem Wurf, von denen zwei ataktische Bewegungsstörungen zeigten, wurden im Alter von 20 Tagen euthanasiert und genotypisiert. Ihr Gehirn wurde entnommen und unter dem Stereomikroskop bei 6-facher Vergrößerung analysiert und fotografiert (Abbildung 28).

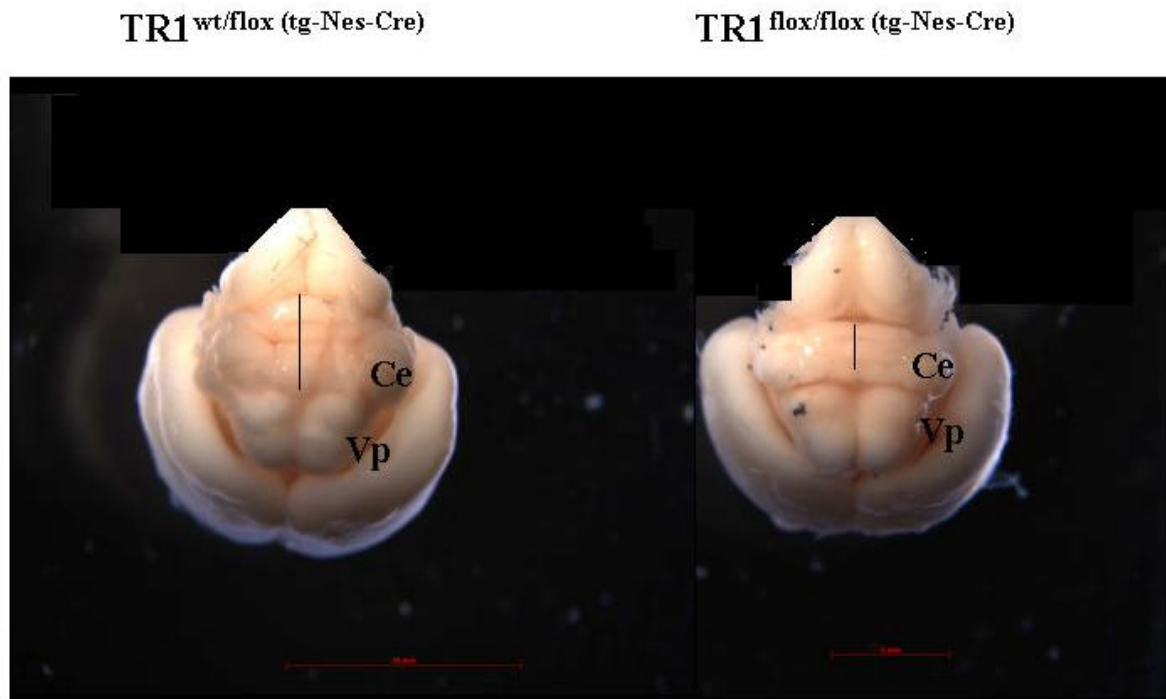


**Abbildung 28: Makroskopische Analyse von Gehirne von 20 Tage alten Tieren**

Die Gehirne der klinisch auffälligen Tiere, die den Genotyp  $TR1^{flox/flox}(Tg-Nes-Cre)$  aufwiesen, sind in der obersten Reihe abgebildet. Diese weisen eine hochgradige Hypoplasie des Cerebellums (Cb) auf, während der zerebrale Cortex (Co) äußerlich nicht auffällig erscheint. Sowohl die Colliculi rostrales als auch die Colliculi caudales der Vierhügelplatte (Vp) wirken hyperplastisch. Die maximale rostro-caudale Ausdehnung des Cerebellums ist jeweils durch eine horizontale Linie markiert.

Die pathologisch-anatomischen Befunde zeigten eine massive cerebelläre Hypoplasie bei den gehirnspezifischen  $TR1$ -Knock-out Mäusen im Alter von 20 Tagen. Bei Tieren, denen das Gehirn im Alter von 7 Tagen entnommen wurde, ist der Unterschied in der Ausdehnung des Cerebellums noch nicht so ausgeprägt (Abbildung 29). Da das Cerebellum bei Mäusen postnatal noch bis etwa 21 Lebenstage nach der Geburt wächst, deutet dieser Befund

darauf hin, dass die TR1-Defizienz in neuronalen Vorläuferzellen zu Proliferationsstörungen des Cerebellums führt.



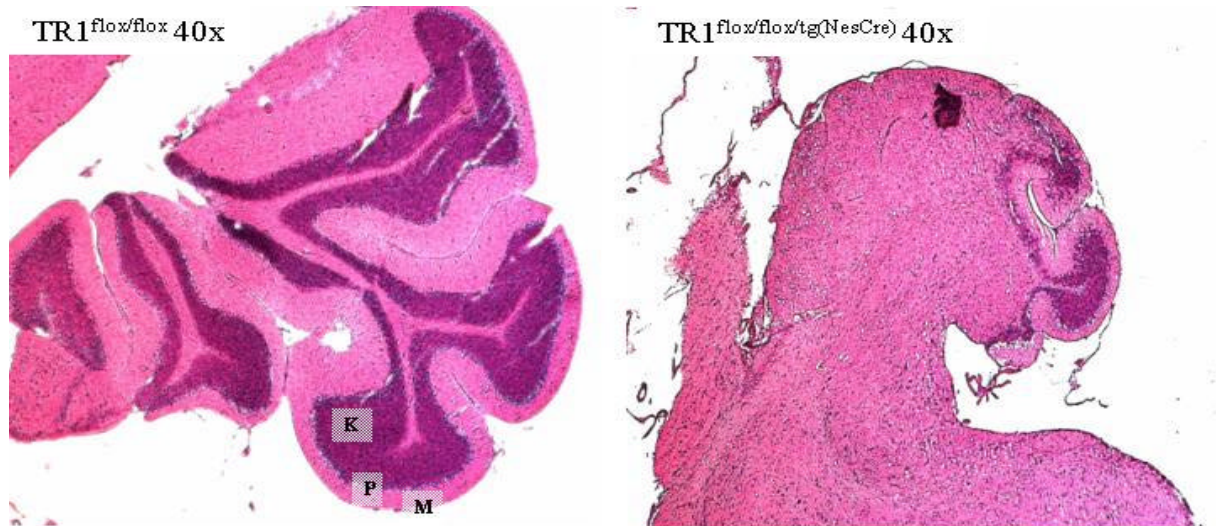
**Abbildung 29: Caudalansicht von Gehirnen von 7 Tage alten Tieren**

Im Vergleich zum Kontrolltier links im Bild, ist die Entwicklung des Kleinhirns (Ce) beim gehirnspezifischen TR1-Knock-out (rechts) zurückgeblieben und die typische Auffaltung der Kleinhirnhemisphären ist undeutlicher als beim Kontrolltier (links). Die Vierhügelplatte (Vp) wirkt beim TR1-Knock-out-Gehirn hyperplastisch.

Zur histologischen Analyse der gehirnspezifischen TR1-Knock-out-Mäuse sollten neben Standardfärbungen wie Hämatoxylin-Eosin und Nissl-Färbung auch histochemische Untersuchungen mit Proliferationsmarkern herangezogen werden. Es wird ein Unterschied im Proliferationsgeschehen im Bereich des Kleinhirns von TR1-Knock-out-Gehirnen versus Kontrollgehirnen erwartet. Die ersten histologischen Schnitte aus dem Kleinhirnbereich von Mäusen im Alter von 21 d sind in Abbildung 30 dargestellt. Dabei handelt es sich um einen Vergleich eines klinisch unauffälligen TR1<sup>flox/flox</sup> Tieres mit einem TR1<sup>flox/flox</sup>/tg(Nes-Cre) Geschwistertier,



das ab dem Alter von zwei Wochen bis zur Organentnahme am 21. Lebensstag Ataxien und Koordinationsstörungen gezeigt hatte.



**Abbildung 30: Histologische Analyse des Kleinhirn von 21 Tage alten Mäusen**

Das Kleinhirn des Kontrolltiers (links, TR1<sup>flox/flox</sup>) hat sich voll entwickelt. Die Abgrenzung der Körnerzellschicht (K), Purkinje-Zellschicht (P) und äußeren Molekularschicht (M) ist gut erkennbar. Im hypoplastischen Kleinhirn des Nestin-Cre-spezifischen TR1-Knock-out-Tieres (rechts) hat die typische Auffaltung der Foliae des Kleinhirns nicht stattgefunden, außerdem ist die Körnerzellschicht zum Teil nur andeutlich gegen die äußere Molekularschicht abgegrenzt.

Der histologische Befund bestätigt den makroskopischen Befund der massiven cerebellären Hypoplasie. Die Kleinhirnschichtung ist bei TR1-defizienten Gehirnen undeutlich, d.h. die Abgrenzung der Molekularschicht, Körnerzellschicht und Purkinje-Zellschicht ist verschwommen. Bei stärkerer Vergrößerung wurden versprengte Zellkerne, bei denen es sich um fehlentwickelte Purkinje-Zellen handeln könnte, beobachtet. Die eindeutige Identifikation der versprengten Zellen muss jedoch erst durch immunhistologische Methoden mit Purkinje-Zell-spezifischen Antikörpern bestätigt werden.

## 4.2 TR2

### 4.2.1 Phänotyp der TR2-Knock-out-Embryonen

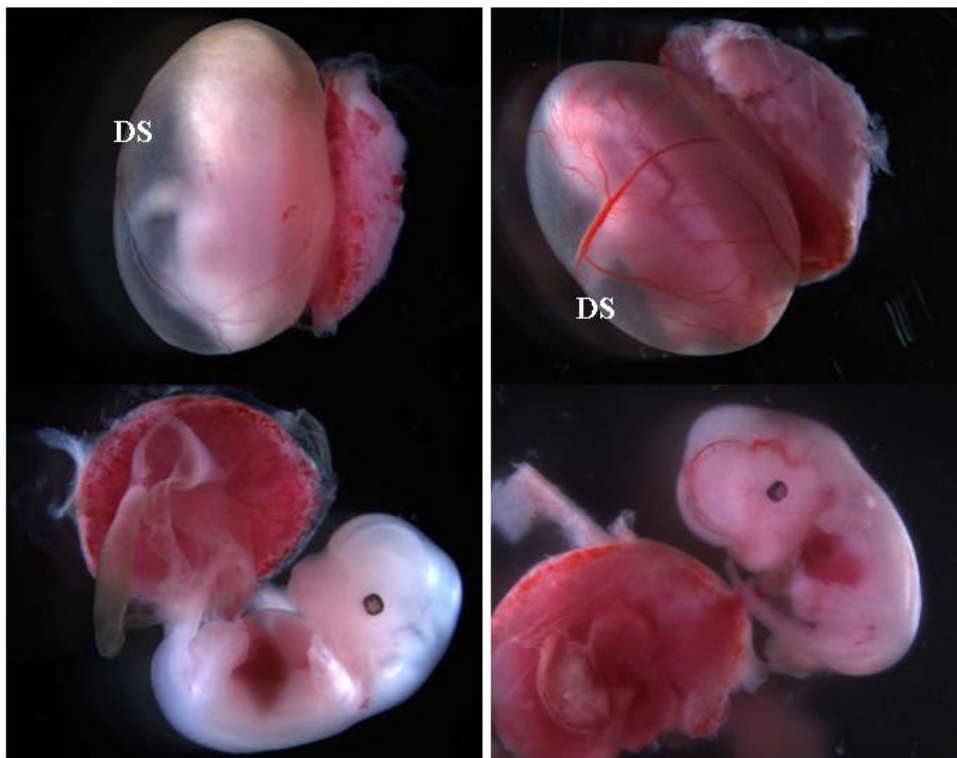
Vergleichend zu den in dieser Arbeit etablierten und beschriebenen TR1-defizienten Embryonen sollten die Studien über die Funktionen der TRn in der Embryonalentwicklung auf die Analyse von TR2-defizienten Embryonen ausgeweitet werden. Heterozygote TR2<sup>wt/del</sup> Knock-out-Tiere waren bereits zuvor von Marcus Conrad (Conrad 2001) etabliert worden. Die Inaktivierung eines Allels der TR2 hatte offensichtlich keinen Einfluß auf das Überleben und die Fertilität von heterozygoten TR2<sup>wt/del</sup> Tieren. Hingegen führt der Verlust beider TR2-Allele zu embryonaler Letalität. Um den Zeitpunkt der embryonalen Letalität zu bestimmen, wurden TR2<sup>wt/del</sup> Tiere miteinander verpaart und die Weibchen einer Plugkontrolle unterzogen. Die Entnahme und Genotypisierung der Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung ermöglichte es, den Tag des embryonalen Todes der TR2-Knock-out-Embryonen zwischen E12.5 und E13.0 zu bestimmen. Zu späteren Zeitpunkten waren nur noch Resorptionen von TR2-Knock-out-Embryonen zu beobachten und an früheren Tagen konnten nur TR2-Knock-out-Embryonen ohne makroskopisch erkennbaren Unterschied zu den Wurfgeschwistern isoliert werden.

### 4.2.2 Makroskopische Betrachtung der TR2<sup>del/del</sup> Embryonen

Am Tag 12.5 der Embryonalentwicklung waren die TR2<sup>del/del</sup> Embryonen äußerlich von ihren Wurfgeschwistern gut zu unterscheiden: Die TR2<sup>del/del</sup> Embryonen waren kleiner, blasser und die Dottersackgefäße schwächer ausgeprägt. Insgesamt wurden etwa 30 Würfe solcher Verpaarungen, bei denen TR2<sup>del/del</sup> Embryonen entstehen konnten, an den embryonalen Entwicklungstagen E11-E13 betrachtet. In Abbildung 31 wurden ein TR2-Knock-out Embryo und ein heterozygoter TR2<sup>wt/del</sup> Embryo am Tag E13.5 der Entwicklung jeweils mit und ohne Dottersack fotografiert.

**TR2<sup>del/del</sup>**

**TR2<sup>wt/del</sup>**



**Abbildung 31: Makroskopische Betrachtung von TR2-Knock-out-Embryonen am Tag E13.5**

Beim homozygoten TR2-Knock-out Embryo (links) sind die Gefäße des Dottersacks (DS) nur schwach gezeichnet, der Embryo ist blasser und es sind keine Kopfgefäße sichtbar.

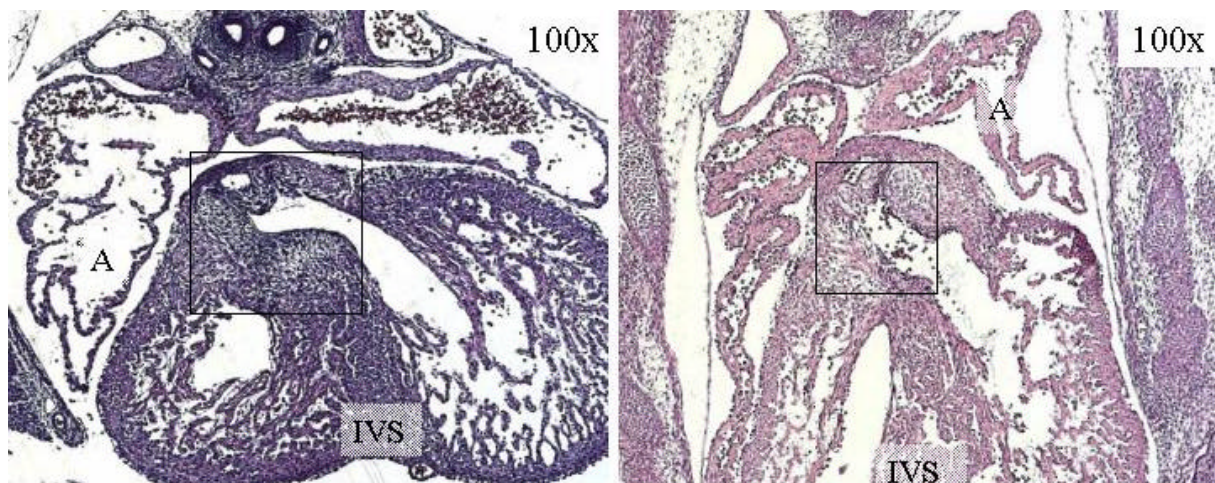
#### 4.2.3 Histologische Untersuchung der TR2<sup>del/del</sup> Embryonen

Für die histologische Untersuchungen wurden jeweils zwei TR2<sup>wt/del</sup> Elterntiere verpaart und an den Tagen E11, E12 und E13 Embryonen entnommen und fixiert.

Bei den TR2<sup>del/del</sup> Embryonen war in der Histologie generell eine Wachstums- und Differenzierungsretardation auffällig. Beispielsweise war in den Nieren Wildtyp-Geschwistern am Tag E13.5 bereits eine Differenzierung von Medulla und Cortex möglich, während die TR2<sup>del/del</sup> Embryonen eine noch undifferenzierte Urniere aufwiesen. Bei Embryonen am Tag E11.5 der Embryonalentwicklung war der Bereich der Kiemenbögen bei Wildtyp-Embryonen bereits segmentiert, wohingegen bei Knock-out-Embryonen keine Segmentierung sichtbar war (vgl. Abbildung 33).

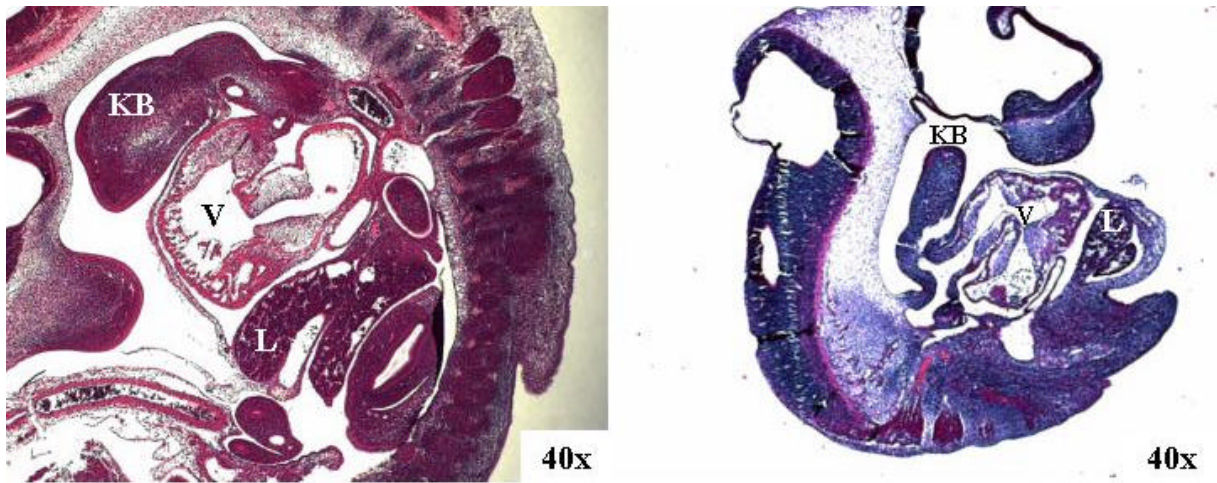


Die Herzregion fiel durch mehrere Befunde bei TR2-Knock-out Embryonen auf. Es konnte mehrfach eine Hypoplasie des Herzkissengewebes („endocardial cushions“) und eine Malformation der Herzklappen beobachtet werden. Die Herzhohlräume wiesen häufiger eine Blutleere auf als bei Kontrollembryonen (vgl. Abbildung 32). Das Myokard der Ventrikel erschien beim TR2-Knock-out-Embryo häufig dünnwandiger und dysstrukturiert. Es gab Hinweise auf Ventrikel- und Atrioseptumdefekte, die allerdings in Hinblick auf die rapiden Wachstums- und Umbauvorgänge des embryonalen Herzen nicht eindeutig verifiziert werden konnten. Im Bereich des Herzkissengewebes konnte teilweise Diskontinuität der Endothelauskleidung festgestellt werden (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Vergleich der Herzregion eines Wildtyp-Embryos (E13.5) mit einem TR2-Knock-out Embryo (E13.5)**

Im Wildtyp Geschwister links ist das Interventrikularseptum (IVS) relativ breit, die atrialen Herzohren (A) sind voluminös und mit Blutzellen angereichert. Im TR2<sup>del/del</sup> Embryo rechts erscheinen die atrialen Herzohren (A) kollabiert, das Interventrikularseptum schwächer und die endotheliale Auskleidung der distalen Herzklappenregion, die von Herzkissengewebe umgeben ist, erscheint unterbrochen. Das eingezeichnete Rechteck zeigt in etwa die Ausdehnung des Herzkissengewebes an.



**Abbildung 33: Vergleich eines TR2<sup>wt/wt</sup> Embryo (E11.5) mit einem TR2<sup>del/del</sup> Embryo (E11.5)**

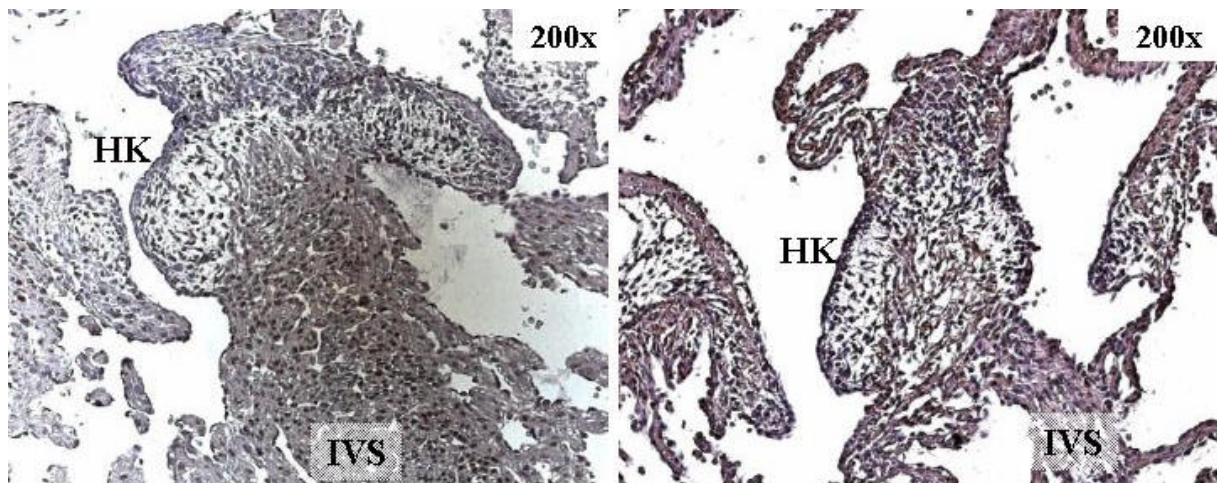
Der Knock-out-Embryo (rechts) ist deutlich kleiner als sein Kontrollgeschwister (links), das bei identischer Vergrößerung nicht vollständig abgebildet werden konnte. Der Kiemenbogen-Bereich (KB) wirkt beim Kontrolltier massiver und bereits für die in der Entwicklung noch ausstehende Segmentation eingeschnürt. Beim TR2-Knock-out-Embryo (rechts) wirkt die Kiemenbogenanlage im Verhältnis zum Herz zu klein, die Herzhohlräume (V) weniger voluminös. (L = Leber)

Um festzustellen, ob ein gestörtes Proliferationsverhalten für die beobachtete Wachstums- und Differenzierungsretardation verantwortlich ist, wurden die Embryonen am Tag E13.5 der Entwicklung immunhistochemische Analysen durchgeführt mit PCNA als Proliferationsmarker unterzogen. PCNA ist eine Komponente der DNA-Replikations-Maschinerie und fungiert als Hilfsprotein der DNA-Polymerase- $\delta$  (Kelman 1997). Abhängig von dem Zellzyklusstadium lokalisiert PCNA in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten. Zellen in der G0-Phase zeigen keine Expression. In der G1-Phase und S-Phase ist PCNA im Zellkern, in der G2-Phase im Zellkern und Zytoplasma und in der M-Phase im Zytoplasma lokalisiert (Foley, Ton et al. 1993).

Bei TR2<sup>wt/wt</sup>-Embryonen deutete die hauptsächlich nukleäre Lokalisation von PCNA im Bereich des Herzkissengewebes, des Myokards und Ventrikelseptum auf eine starke Proliferation hin. Vergleichsweise dazu erschienen beim TR2<sup>del/del</sup>-Embryo v.a. im Herzkissenbereich eine größere Anzahl von Zellkernen nur mit Hämatoxylin gefärbt, während vermehrt



zytoplasmatische Strukturen PCNA-positiv erschienen (siehe Abbildung 34). Bei TR2<sup>del/del</sup> Embryonen schien somit der PCNA-Antikörper weniger an Zellkerne und vermehrt an zytoplasmatische Strukturen zu binden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Proliferationsrate im Herzbereich bei den TR2-Knock-out Embryonen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollembryonen verringert war. Weitere Analysen mit Zellzyklusspezifischen Markern, z.B. Zyklinen, werden folgen, um die Proliferation der Gewebe studieren zu können.



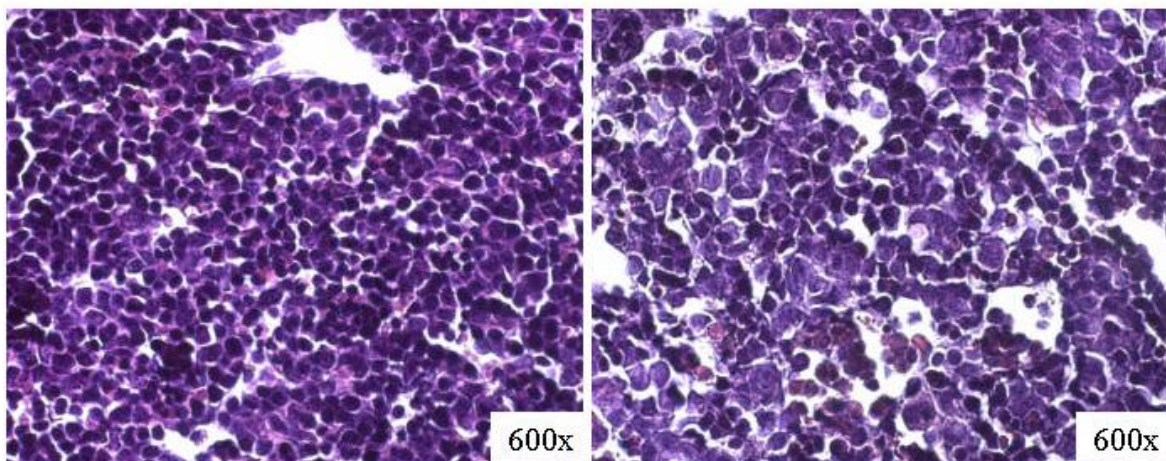
**Abbildung 34: PCNA-Immunhistochemie des Herzklappenbereichs (E13.5) (Hämatoxylin-Gegenfärbung)**

Beim Wildtyp-Embryo (links) erscheint das Herzkissengewebe (HK) im Bereich der Herzklappen als lockeres mesenchymales Gewebe, das sich vom Interventrikularseptum (IVS) gut abgrenzen lässt. Nahezu alle Zellkerne sind durch immunhistochemische Reaktion mit dem PCNA-Antikörper intensiv bräunlich gefärbt. Im TR2-Knock-out-Embryo (rechts) erscheinen einige Zellkerne v.a. im Bereich des IVS PCNA-negativ, im Bereich des Herzkissengewebe (HK) erscheinen zytoplasmatische Strukturen PCNA-positiv während die Kerne ausschließlich mit Hämatoxylin gegengefärbt waren.

#### 4.2.4 Hämatopoese bei den TR2-Knock-out-Embryonen

##### 4.2.4.1 Histologische Betrachtung der embryonalen Leber

Eine weitere Ursache für die blass und anämisch erscheinenden TR2-Knock-out-Embryonen könnte die Folge einer unzureichenden Blutbildung sein und deshalb wurden Untersuchungen zur Hämatopoese durchgeführt. Dazu wurde zunächst die fetale Leber als Ort der embryonalen Hämatopoese bei E12.5 und E13.5 Embryonen histologisch untersucht (vgl. Abbildung 35). Die Gewebsstruktur der Leber von TR2<sup>del/del</sup> Embryonen war inhomogener als die der Kontrollembryonen. Die Anzahl der Zellen mit intensiver Kernfärbung war bei den TR2-Knock-out-Embryonen geringer, die Form der Zellen und Zellkerne insgesamt ungleichmäßiger und etliche Zellkerne erschienen kleiner. Die eindeutige Feststellung von Kernpyknosen war aufgrund der sehr heterogenen Struktur der stark proliferierenden, embryonalen Leber mit einem Anteil von etwa 80% Blutzellen um diesen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung jedoch nicht einwandfrei möglich. Zur Feststellung von Apoptose werden weitergehende Untersuchungen folgen.

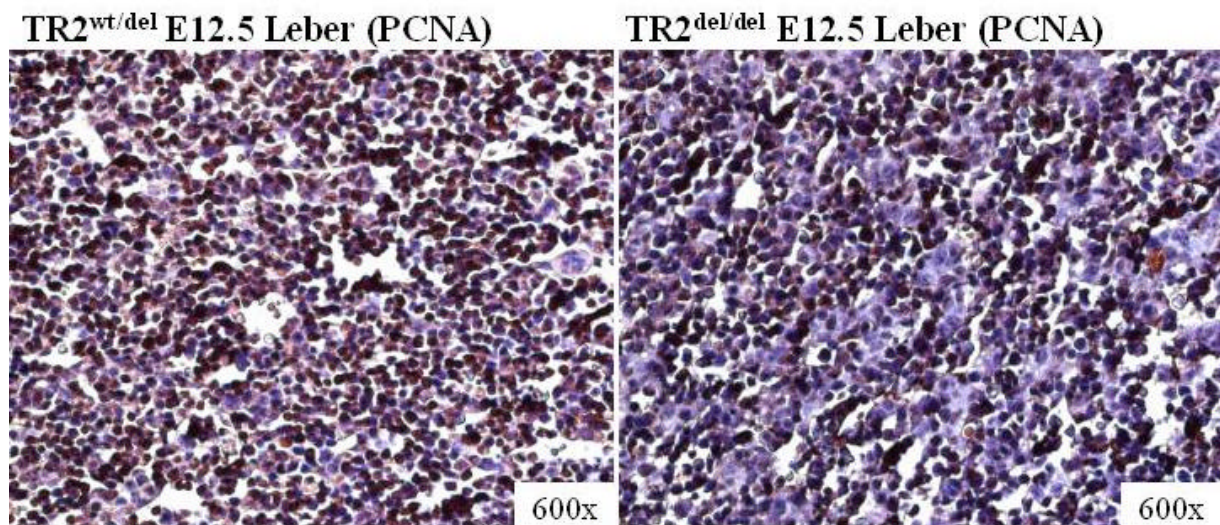


**Abbildung 35: Leber von E12.5 Embryonen**

Die Leber des TR2-Knock-out Embryos (rechts) erscheint lockerer, das Kern-Zytoplasma-Verhältnis kleiner als beim Kontrolltier (links). Hämatoxylin-Eosin-Färbung)



Auch bei den Leberzellen von TR2-Knock-out-Embryonen wurde das Proliferationsverhalten mittels PCNA-Immunhistochemie analysiert (vgl. Abbildung 36). Dabei wies die Leber der TR2-Knock-out-Embryonen, wie zuvor auch schon im Herzgewebe beobachtet, weniger braun gefärbte Zellkerne auf, Indiz dafür, dass die Proliferationsrate der TR2-defizienten embryonalen Leberzellen geringer ist.

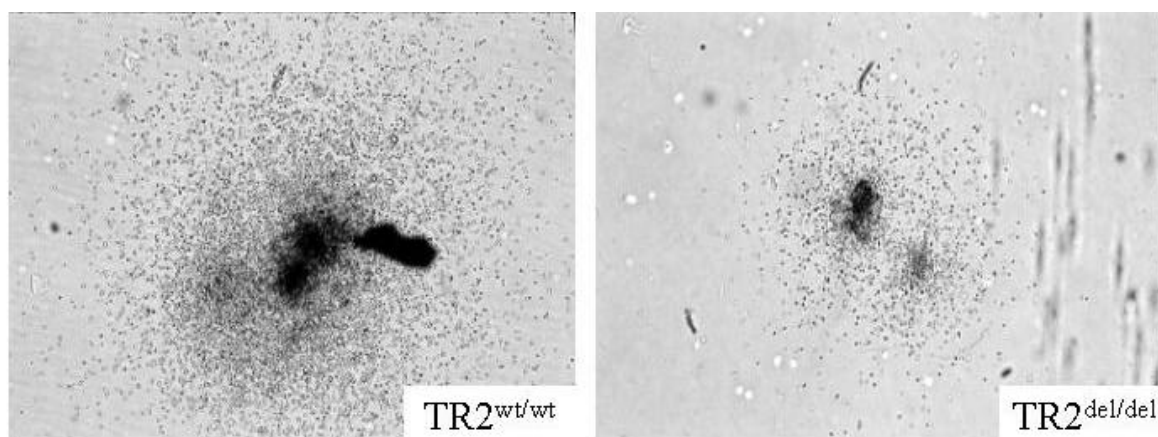


**Abbildung 36: Embryonale Leber von TR2-Knock-out Embryonen (PCNA-Immunhistologie mit Hämatoxylin-Gegenfärbung)**

Beim Kontrolltier (links) erscheinen die meisten Zellkerne PCNA-positiv, wohingegen beim TR2-Knock-out Embryo (rechts) bei identischer Vergrößerung deutlich weniger Zellkerne braune Färbung aufweisen, somit weniger Zellkerne mit dem PCNA-Antikörper reagierten.

#### 2.4.4.2 Zellkultur von embryonalen Blutvorläuferzellen

Zur Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der embryonalen Blutvorläuferzellen wurde ein „Colony Forming Unit“ (CFU) - Experiment durchgeführt. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen, gewonnen aus embryonaler Leber von Wildtyp- und TR2-Knock-out-Embryonen (E13.0), bei gleicher Zellzahl in Methylcellulose ausplattiert und für 1 Woche mit Serum und Wachstumsfaktoren für die Hämatopoese (siehe Abschnitt 3.5.4) kultiviert. Nach einwöchiger Inkubation der Blutstammzellen zeigten die gewachsenen Blutzellkolonietypen bei Knock-out- und Kontrollzellen ein gleichartiges Verteilungsmuster, d.h. alle verschiedenen Blutzelllinien konnten sich differenzieren. Allerdings war die Größe der einzelnen Kolonien bei TR2-Knock-out-Zellen um ein Vielfaches kleiner, somit bestanden die Kolonien aus weniger Zellen (siehe Abbildung 37). Ähnlich wie bei den Beobachtungen anhand des Proliferationsmarkers PCNA wurde somit auch bei Blutvorläuferzellen mit Hilfe des CFU-Experiments eine reduzierte Proliferationsrate bei TR2-defizienten Blutstammzellen festgestellt.



**Abbildung 37: Kultur von embryonalen Blutvorläuferzellen**

Bei beiden Kolonien handelt es sich um eine gemischte Kolonie mit zentral dicht gepackten granulozytären und erythroiden Zellen. Bei den radiär vom Zentrum abgewanderten Zellen handelt es sich um Makropagen. Der Ausdehnungsradius der TR2-Knock-out-Kolonie (rechts) ist kleiner, die Gesamtzellzahl wesentlich geringer (Beide Aufnahmen wurden bei identischer Vergrößerung fotografiert).

Zusammenfassend war am Phänotyp der TR2-Knock-out-Embryonen das anämische Erscheinungsbild am auffälligsten. Immunhistologisch und durch das Wachstumsverhalten isolierter Blutvorläuferzellen konnte bei TR2-defizienten Zellen eine geringere Proliferationsrate festgestellt werden, die sich nicht zuletzt auch in der geringeren Körpergröße der TR2-Knock-out-Embryonen manifestierte. Die Ursache für das anämische Erscheinungsbild kann sowohl mit einer nach dem histopathologischen Befund zu erwartenden Kreislaufinsuffizienz, als auch verringerten Hämatopoeserate erklärt werden. Die Todesursache der Embryonen bleibt zunächst ungeklärt.

Zur Klärung dieser Frage sind Verpaarungen von TR2<sup>flox/flox</sup> Tieren mit MLC2a-Cre transgenen Tieren geplant (Minamisawa, Gu et al. 1999). Dadurch soll die TR2 spezifisch in Herzwewebe ausgeschaltet werden. Sollte die herzspezifische Ausschaltung der TR2 ebenfalls zu Letalität führen, würde dies der TR2 eine bedeutende Funktion in der Physiologie des Herzens einräumen.

## 5 Diskussion

### 5.1 TR1

Bei der Etablierung von TR1-defizienten Mäusen stellte sich heraus, dass homozygote TR1-Knock-out-Mäuse ( $TR1^{del/del}$ ) während der Embryonalentwicklung sterben. Heterozygote  $TR1^{wt/del}$  Tiere zeigten über einen Beobachtungszeitraum von etwa einem Jahr keine klinischen Auffälligkeiten, sodass das Vorhandensein eines funktionellen TR1-Allels für ein Überleben ausreichend ist. Wie die Analysen zeigten, starben  $TR1^{del/del}$ -Embryonen etwa am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung. Bei der Phänotypisierung von genetisch veränderten Mausstämmen mit embryonaler Letalität, dient der Todeszeitpunkt als wichtiges Klassifizierungskriterium. Entsprechend der Unterteilung der Embryonalentwicklung in Präimplantationsphase, Periimplantationsphase, Plazentationsphase, Organogenese- und schließlich der fetalen Wachstum- und Differenzierungsphase fällt die embryonale Letalität um den Zeitpunkt E9.5 in die Organogenese-Phase. In dieser Phase ist mit embryonaler Letalität zu rechnen, wenn bedeutende Faktoren für Wachstum und Differenzierung der Organe fehlen. Als Beispiel sei hier ein Wachstumsfaktor für Vaskulogenese genannt: Beim VEGF-Knock-out (*Vascular Endothelial Growth Factor*) kommt es zur embryonalen Letalität in der Phase der Endothelentstehung (E8.5-E9.5) (Ferrara, Carver-Moore et al. 1996).

Wie bereits erwähnt liegt der Zeitpunkt des Todes der  $TR1^{del/del}$  Embryonen (E9.5) inmitten der Phase der Organogenese, wobei Mausembryonen am Tag 9.0 der Gestation die für Nagetiere typische embryonale Drehung vollzogen, den rostralen Bereich der Neuralrinne geschlossen, ein schlagendes Herz und etwa 15-18 Somiten entwickelt haben sollten. Die  $TR1^{del/del}$  Embryonen zeigten in den histologischen Befunden aber höchstens ein Entwicklungsstadium, das mit E8.0 vergleichbar ist, was sich v.a. dadurch manifestierte, dass die ektodermalen Embryonalgewebe noch nicht an die Außenfläche des Embryos gedreht waren und die Neuralrinne an keiner



Stelle geschlossen war. Die Organogenese der TR1<sup>del/del</sup> Embryonen hatte zwar begonnen, da z.B. eine primitive Herzanlage bereits sichtbar war, auffallend war aber das Fehlen einer Segmentation des embryonalen Körpers und das Fehlen von Somiten. Sowohl in den makroskopischen als auch histologischen Analysen konnten bei den TR1<sup>del/del</sup> Embryonen keine Somiten identifiziert werden. Bei der Maus beginnt die Somitogenese am Tag 8 der Embryonalentwicklung. Die Somitogenese ist ein Prozess, bei dem das paraxiale Mesoderm durch zeitlich oszillierende Genaktivierung in gleichmäßige Segmente unterteilt wird (Pourquie 2002), (Gossler und Hrabe de Angelis 1998). Die einzelnen Somiten entstehen durch Segmentierung des paraxialen Mesoderms, das bilateral neben Notochord und Neuralrohr verläuft (Pourquie 2001). Dabei werden die einzelnen Embryonalstadien auch durch die Anzahl der bereits gebildeten Somiten charakterisiert. An Tag E8-8.5 sind 1-10 Somiten, an Tag E8.5-9.5 11-20 Somiten, an Tag E9.5-10 21-30 Somiten und an Tag E10- 10.5 bereits 31-36 Somiten sichtbar (Kaufman 1992). Aus den Somiten entstehen die Skelettmuskulatur des Körpers, die Wirbelsäule und Teile der Haut. Die Struktur des paraxialen Mesoderms der TR1<sup>del/del</sup> Embryonen war im Bereich des Kopfmesenchyms und auch im caudalen Körperbereich histologisch durch ein uneinheitliches Erscheinungsbild aufgefallen, allerdings unterliegt embryonales Gewebe allgemein starken Umbau- und Transdifferenzierungsprozessen. Erst durch eine statistisch signifikante Anzahl histologisch analysierter Embryonen wird dieser Befund verifiziert werden können. Die Bedeutung der TR1 in der Somitogenese bleibt zunächst ungeklärt, möglicherweise spielt die TR1 schon bei der Segmentierung der Körperachse des Mausembryos eine wichtige Rolle.

Wichtig für die Beurteilung des Phänotyps der TR1-Knock-out-Embryonen ist die Tatsache, dass sie in ihrer Entwicklung stark retardiert waren. Mausembryonen innerhalb eines Wurfes können in ihrer Embryonalentwicklung physiologischerweise bis zu 12 Stunden voneinander differieren. Die TR1<sup>del/del</sup> Embryonen waren in ihrer Entwicklung 24 bis 48 Stunden von den Kontrollwurfgeschwistern entfernt, wodurch sich die Frage stellt, ob die TR1 für Proliferationsprozesse generell von Bedeutung ist.

Ein Hinweis darauf, dass die TR1 in Zellproliferation involviert sein könnte, ergab sich aus Untersuchungen zu Funktionen von c-Myc und den von c-Myc regulierten Genen. c-Myc ist ein multifunktionseller Transkriptionsfaktor, der an Zellproliferation, -wachstum, -differenzierung, Apoptose und anderen intrazellulären Vorgängen beteiligt ist (Übersicht in (Grandori, Cowley et al. 2000)). Die TR1 wurde als Zielgen von c-Myc identifiziert (Schuhmacher, Kohlhuber et al. 2001). Welche Bedeutung die TR1 als von c-Myc aktiviertes Gen innerhalb des Zellzyklus spielt, ist ungeklärt. Die starke Wachstumsretardation der TR1<sup>del/del</sup> Embryonen lässt aber die Frage nach der Bedeutung der TR1 in Zellzyklusprozessen und Zellproliferation aufkommen.

c-Myc reguliert u.a. *p53* und *p21* und damit Gene, die innerhalb des Zellzyklus wichtige Funktionen ausüben. Das Tumorsuppressorgen *p53* ist in einer Vielzahl von Tumoren deletiert bzw. mutiert. Physiologischerweise leitet es Zellen mit DNA-Schäden in den G1-Zellzyklusarrest oder in Apoptose. *p21* ist ein Zyklin-abhängiger Kinase Inhibitor ("CDKN1A") und wird als Effektor von *p53* innerhalb der Zellzykluskontrolle verstanden. Während *p21* von *p53* aktiviert wird, um den Zellzyklus zu arretieren, vermag c-Myc die *p21*-Expression zu inhibieren (Seoane, Le et al. 2002), sodass der arretierende Effekt von *p21* auf den Zellzyklus unterbunden wird und die Zellen vermehrt proliferieren können.

Funktionelle Zusammenhänge zwischen *p53* und TR1 wurden bereits mehrfach beschrieben. Die Aktivität von *p53* scheint von einem intakten Trx1/TR1 System abhängig zu sein, da in TR1-defizienten Hefen eine durch *p53* gesteuerte Hochregulierung von Vektorkonstrukten mit  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen nicht mehr möglich war (Merwin, Mustacich et al. 2002). Moos und Kollegen konnten *in vitro* zeigen, dass eine Inhibierung der TR1-Aktivität durch elektrophile Prostaglandine zur Inaktivierung von *p53* führt (Moos, Edes et al. 2002).

Fragen bezüglich der Funktion der TR1 in Proliferationsvorgängen könnten durch *in vitro* Zellkultursysteme bearbeitet werden. Geplant sind Experimente mit primären TR1<sup>flox/flox</sup> Zellkulturen, die durch Organentnahmen aus TR1<sup>flox/flox</sup> Tieren gewonnen werden. Durch *in vitro* Expression der Cre-Rekombinase, z.B. in Form eines transienten

Expressionvektors, kann die TR1 in den TR1<sup>flox/flox</sup> Zellen *in vitro* ausgeschaltet werden und danach das Proliferationsverhalten der TR1-defizienten Zellen studiert werden.

Neben dieser Möglichkeit bietet das konditionale TR1-Knock-out-Konstrukt die Möglichkeit, die TR1 nur in bestimmten Organen auszuschalten, was bereits mit der Verpaarung von TR1<sup>flox/flox</sup> und Nestin-Cre-transgenen Tieren vollzogen wurde. Die Inaktivierung der TR1 in neuronalen Vorläuferzellen führt zu Wachstumsproblemen des Kleinhirns bei neugeborenen Tieren. Das Kleinhirn der Maus wächst postnatal etwa bis zum 21. Lebenstag. Im Falle der TR1<sup>flox/flox/tg(Nes-Cre)</sup> entfalten sich die Kleinhirnhemisphären nicht und die typische Schichtung des Kleinhirns in äußere Molekularschicht, Purkinje-Zellschicht und Körnerzellschicht erscheint verschwommen. Ein fast identischer histologischer Befund des Cerebellums wurde zuvor bei Nestin-Cre spezifischen N-Myc-Knock-out-Mäusen beschrieben (Knoepfler, Cheng et al. 2002). Knoepfler und Kollegen benutzten für die Etablierung einer gehirnspezifischen N-myc-Knock-out-Mauslinie den in dieser Arbeit herangezogenen Nestin-Cre transgenen Mausstamm (Tronche, Kellendonk et al. 1999). N-myc wird mit c-myc und v-myc zur Familie der retroviralen Proto-Onkogene zusammengefasst (Übersicht in (Grandori, Cowley et al. 2000)). Die Phänotypisierung der bereit im Jahre 1992 etablierten N-myc-Knock-out-Mäuse (Charron, Malynn et al. 1992) zeigte, dass N-myc für die Embryonalentwicklung notwendig ist. N-myc-Knock-out-Embryonen sterben zwischen dem Tag E10.5 und E12.5 mit multiplen Störungen in der Organogenese.

Sowohl der Nestin-Cre gewebspezifische Knock-out für TR1 als auch für N-myc zeigen eine massive cerebelläre Hypoplasie, ataktische Bewegungsstörungen bei den Jungtieren und verringerte Körpergewichtszunahmen. Auch die histologischen Befunde des Kleinhirns sind sehr ähnlich (Knoepfler, Cheng et al. 2002). Da Kontrolltiere mit einem Nestin-Cre Transgen diesen Phänotyp nicht zeigten, kann die Ähnlichkeit nicht auf das Nestin-Cre-Transgen zurückgeführt werden. N-Myc reguliert für Proliferationsprozesse essentielle Gene und induziert aufgrund der großen Gemeinsamkeiten mit c-Myc höchstwahrscheinlich dieselben Gene (Schuhmacher, Kohlhuber et al. 2001). TR1 wurde als Zielgen von c-Myc

identifiziert und deshalb stellt sich die Frage, ob (a) TR1 direkt an der Proliferation wie z.B. Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Ribonukleotidreduktase und somit am DNA-Metabolismus beteiligt ist, oder ob (b) die TR1 über Trx individuell an der Modulation von Transkriptionsfaktoren, die wiederum das Proliferationsgeschehen beeinflussen können, involviert ist. Bei *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Trx im Nukleus von Zellen die Aktivität von diversen Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann, z.B. dem DNA-Reparaturenzym Ref-1 (Hirota, Matsui et al. 1997). Ob funktionelle Zusammenhänge zwischen N-myc und TR1 bestehen, muss noch geklärt werden.

Inwiefern die TR1 bei der Pathogenese von menschlichen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte und ob das hier beschriebene TR1-Knock-out-Mausmodell sich als Modell für menschliche Erkrankungen eignet, soll im Folgenden erörtert werden. Zunächst muss der Genlocus des entsprechenden Gens beim Menschen untersucht werden. Die TR1 des Menschen ist auf Chromosom 12q23-q24.1 lokalisiert. Auf diesem Chromosomenlocus sind u.a. zwei Erbkrankheiten bekannt, deren zugrundeliegende Gene nicht genau bekannt sind. Die *Porokeratitis* (OMIM 175900), eine UV-Licht induzierte Erkrankung der Haut mit Hyperproliferation atypischer Keratinozyten und die *Spinale Muskelatrophie* (OMIM 600175), eine Degeneration der Vorderhornzellen des Rückenmarks, die zu Muskelatrophie führt. Da der Chromosomenlocus der TR1 beim Menschen bislang nicht so gut untersucht ist, wie z.B. der Locus der TR2 (22q11), könnten weitere noch unerkannte Erbkrankheiten ebenfalls an diesem Locus zu finden sein.

Eine wichtige Bedeutung der TR1 für die Physiologie der Haut konnte durch Messung der TR1-Enzymaktivität in unterschiedlich stark pigmentierten Hauttypen festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Thioredoxinreduktase in der Haut mit dem Pigmentierungsgrad positiv korreliert (Schallreuter und Wood 2001). Schon vor rund zwei Jahrzehnten wurde beobachtet, dass Selen die Haut vor UV-Licht induzierten Schäden schützen kann. Dies konnte im Selenfütterungsversuch mit haarlosen Mäusen gezeigt werden. Die mit Selen supplementierten Tiere zeigten nach experimenteller UV-Bestrahlung weniger Hautschäden als die nicht

supplementierten Tiere (Thorling, Overvad et al. 1983). Möglicherweise steht die protektive Wirkung von Selen in der Haut mit dem Selenoprotein Thioredoxinreduktase in direktem Zusammenhang. Die Zucht von hautspezifischen TR1-Knock-outs durch Verpaarung mit Keratin-spezifischen Cre-transgenen Mäusen könnte diese Fragestellung beleuchten. Geplant ist die Verwendung der K14-Keratin-Cre transgenen Mauslinie (Pasparakis, Courtois et al. 2002). Dabei darf allerdings nicht vergessen werden, dass in der Haut neben der Thioredoxinreduktase auch andere Selenoproteine, z.B. Glutathionperoxidasen, exprimiert werden, die mit dem protektiven Effekt von Selen in der Haut in Zusammenhang stehen könnten.

## 5.2 TR2

Embryonen defizient für die mitochondriale TR2 sterben zwischen Tag E12.5 – E13.5 der Embryonalentwicklung. Die Organogenese ist zu diesem Zeitpunkt weitgehend abgeschlossen. Wichtige Ereignisse an diesem Tag der Embryonalentwicklung sind die Differenzierungsvorgänge im Bereich der großen herzabführenden Gefäße und der Kiemenbogenarterien. Durch massive Umbauvorgänge in dieser Region entsteht aus dem paarigen Vorläufer die unpaarige Aorta und die Unterteilung des Herzens in vier Kammern durch Ausbildung des atrialen und ventrikulären Septums. Am Tag E13.0 erscheinen erstmalig Herzklappen. Die TR2<sup>del/del</sup> Embryonen sind bereits am Tag E12.0 auffallend kleiner und blasser. Gravierende Missbildungen oder das Fehlen von bestimmten Organen konnten nicht festgestellt werden. Einhergehend mit der geringeren Körpergröße der TR2<sup>del/del</sup> Embryonen ist auch der Entwicklungsstatus der Organe bei TR2-Knock-out-Embryonen verglichen mit Kontrolltieren nicht so weit fortgeschritten. Mehrere Ursachen können für das äußerlich blass-anämische Erscheinungsbild der TR2<sup>del/del</sup> Embryonen verantwortlich sein. Ein Grund könnte eine generalisierte Störung in der Vaskulogenese sein. Histologisch findet man jedoch darauf keinen Hinweis, da z.B. Aortenäste oder Anteile der *Vena cava* gut ausgebildet sind (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse der fetalen Hämatopoese der TR2-Knock-out-Tiere konnte kein qualitativer Unterschied zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden, da nach der

*in vitro* Differenzierung von Vorläuferzellen gleichermaßen alle verschiedenen Blutzelltypen entstanden waren. Die erheblich geringeren Größen der Zellkolonien beim TR2-Knock-out könnten somit die Folge einer geringeren Proliferationsrate bei TR2-defizienten hämatopoetischen Zellen sein. Dies würde somit eine Ursache für das anämische Erscheinungsbild liefern. Eine weitere Ursache könnte in einer Kreislaufinsuffizienz liegen. Bei der histologisch-anatomischen Analyse der Herzstruktur sind deutliche morphologische Veränderungen im Bereich des Herzkissengewebes und des Myokards von TR2<sup>del/del</sup> Embryonen festgestellt worden.

Das Herz ist mesodermalen Ursprungs und entsteht zunächst aus dreierlei Schichten (Keyes und Sanders 1999): Innen befindet sich das Endokard, außen das Myokard und dazwischen liegt eine gallertige Matrix (Eisenberg und Markwald 1995). Bestimmte Subpopulationen des endokardialen Endothels transdifferenzieren zu mesenchymalen Zellen und wandern in die Gallertmasse ein. Dabei entstehen Ausstülpungen, die sogenannten "Herzkissen" ("endocardial cushions"). Aus den Herzkissen entstehen später Herzklappen, Teile des Herzseptums und der großen abführenden Herzgefäße. Die ungestörte Entwicklung der Herzkissen ist nach Eisenberg und Markwald abhängig von einer regional definierten Anschwellung der gallertigen Matrix, einer Metaplasie endothelialer Zellen zu Mesenchym, der Einwanderung dieser transformierten Zellen in die gallertige Matrix und von Faktoren aus dem Myokard, die für die Transformation der Zellen notwendig sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zusätzlich auch Zellen aus der Neuralleiste in das Herzkissengewebe einwandern. Die Herzklappenentwicklung ist ein komplizierter Differenzierungsprozess, der von Zellkoordination, -transformation und lokalem, programmiertem Zelltod geprägt wird und noch nicht vollständig geklärt ist (Keyes und Sanders 2002).

Bei den TR2<sup>del/del</sup> Embryonen wurden Malformationen im Bereich der Herzklappen beobachtet. Möglicherweise hat die Defizienz der TR2 v.a. in solchen Regionen besondere Auswirkungen, die so kompliziert regulierten morphogenetischen Prozessen unterworfen sind, wie die Herzklappenentwicklung. Die Malformationen des Herzens beschränken sich nicht nur auf die Herzklappen, sondern betreffen auch das Myokard und gehen

womöglich mit einer Myokardinsuffizienz einher, die zu ungenügender Blutzirkulation beim wachsenden Embryo führt, was wiederum die äußerliche Blässe erklären würde und die Todesursache der Embryonen sein könnte.

Da die mitochondriale TR vermutlich für die Integrität von Mitochondrien eine essentielle Rolle spielt, wird sich das Fehlen der TR2 besonders in mitochondrienreichen Organen wie Herz oder Leber widerspiegeln (Tanaka, Hosoi et al. 2002). Zwar sind auch die Skelettmuskulatur und das Gehirn reich an Mitochondrien, diese Organe spielen während der Entwicklung von Mäusen aber keine lebensnotwendige Rolle, wie z.B. durch den *Lim1*-Knock-out gezeigt werden konnte, bei dem Mäuse ohne Kopf geboren wurden (Shawlot und Behringer 1995). Andererseits handelt es sich bei der TR2 um ein ubiquitär exprimiertes Gen, dessen Defizienz generalisierte pathologische Prozesse z.B. im Sinne einer generalisierten Wachstumsstörung erwarten lässt, welche nicht minder ausschlaggebend für den Embryontod sein könnten.

Folgt man dem Postulat von Copp et al. und erachtet nur die drei Organsysteme Plazenta, Leber und Herz-Kreislaufapparat ab dem Tag E12.5 der Mausentwicklung für lebenswichtig, so kann man die Plazenta als Todesursache bei TR2<sup>del/del</sup> Embryonen ausschließen, da die histologische Untersuchung hier keine Auffälligkeiten ergab (Daten nicht gezeigt). Die Leber als Ort der embryonalen Hämatopoese kann aufgrund der festgestellten verringerten Anzahl von Blutzellen als Ursache für den Tod der Knock-out-Embryonen nicht ausgeschlossen werden. Eine Kreislaufinsuffizienz würde zusätzlich die Verteilung der in der Leber ohnehin schon in verringerter Menge gebildeten Blutzellen in den peripheren Körperkreislauf erschweren, wodurch dem wachsenden Embryo nicht genügend Nährstoffe zur Verfügung stünden. Die Funktion der embryonalen Hepatozyten wurde dabei bislang noch nicht untersucht. Die einfache histologische Analyse der Leber der TR2-Knock-out Embryonen lieferte keine Hinweise auf eine gestörte Hepatozytenfunktion. Die Frage, inwiefern die Hepatozyten an der Pathogenese der TR2-Knock-out-Embryonen teilhaben, kann womöglich durch immunhistochemische Methoden bearbeitet werden,

bei denen gleichzeitig leberzellspezifische, blutzellspezifische und Proliferationsmarker oder Apoptosefärbungen verwendet werden.

Welches Organsystem bei TR2-Defizienz am stärksten beeinträchtigt ist, kann möglicherweise durch gewebspezifische Ausschaltung der TR2 in Leber und Herz studiert werden. Wie im Falle des TR1-Knock-out-Mausmodells handelt es sich auch bei der TR2-Knock-out-Maus um ein konditionales Konstrukt. Für einen herzspezifischen Knock-out werden zur Zeit bereits TR2<sup>flox/flox</sup> Tiere mit „MLC2a-Cre“-transgenen Mäusen verpaart (Minamisawa, Gu et al. 1999). Sollte dadurch die herzspezifische Inaktivierung der TR2 gelingen, kann die herzspezifische Bedeutung der TR2 besser untersucht werden.

Im Weiteren sind Studien mit embryonalen Fibroblastenzellkulturen geplant, die aus Embryonen am Tag E12.0 der Entwicklung gewonnen werden können. Mit diesen primären Zellkulturen können Vergleichsstudien zwischen TR2-defizienten versus Wildtyp-Fibroblasten angestellt werden, z.B. bezüglich ihres Proliferations- und Apoptoseverhaltens oder hinsichtlich ihres Energiemetabolismus.

Abschließend zur Betrachtung des Phänotyps der TR2-Knock-out-Mausembryonen soll im Folgenden noch der Genlokus der TR2 des Menschen (22q11.2) betrachtet werden, welcher bereits durch genomische Sequenzierung gut charakterisiert wurde. In diesem Genlokus lokalisiert eine Krankheit, die unter der Bezeichnung „Di-George-Syndrom“ bekannt ist und auch als „*Velo-Cardio-Facial-Syndrome*“ bezeichnet wird (McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine 2000). Es handelt sich dabei um eine Erbkrankheit mit partieller Monosomie 22q11, die zu Entwicklungsstörungen der 3. und 4. Schlundtasche führt. Typisch sind u.a. Missbildungen im Bereich des Gesichtsschädels, Gaumens, Thymus, Schilddrüse, Nebenschilddrüse und conotruncale Herzdefekte. Zum Symptomenkomplex des menschlichen DiGeorge Syndroms gehören die Fallot'sche Tetralogie mit Pulmonalisstenose, Kammerscheidewanddefekt und Rechtsverlagerung der Aorta, des weiteren persistierender Truncus arteriosus, Stenose der Aortenklappen, aberrante rechte Arteria subclavia und eine Diskontinuität des Aortenbogens. Genetisch handelt sich um eine Mikrodeletion im Chromosomenbereich 22q11.2 (Übersicht in (Maynard,



Haskell et al. 2002)). Den meisten betroffenen Patienten fehlt auf einem Allel etwa ein Bereich von 3 Mb, welcher etwa 30 Gene, darunter auch das Gen der TR2, enthält. Ein Zusammenhang des DiGeorge Syndroms und fehlender TR2-Enzymaktivität ist bislang nicht beschrieben worden. Der Phänotyp der TR2-Knock-out-Embryonen deutet auf eine Funktion der TR2 im Bereich der Herzentwicklung hin. Die TR2 könnte also ursächlich am Symptomenkomplex des DiGeorge Syndroms beteiligt sein, wobei bei den heterozygoten TR2-Knock-out-Mäusen bis zum Alter von 1,5 Jahren bislang keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt wurden. Beim DiGeorge Syndrom handelt es sich allerdings, wie bereits erwähnt, nicht um die Mutation eines einzelnen Gens, sondern ist die Folge des haploiden Zustand von etwa 30 Genen gleichzeitig. Dennoch gehen derzeit die wissenschaftlichen Bestrebungen dahin, zunächst jedes einzelne der betroffenen Gene in seiner Funktion zu analysieren, um so seine Rolle innerhalb der vielen Symptome, die unter der Bezeichnung „DiGeorge“ zusammengefasst werden, zu verstehen. Doppel- oder Dreifach-Knock-outs von geeigneten Kandidatengenen können in Zukunft möglicherweise den Schlüssel für die dem Krankheitsbild zugrundeliegende genetische Mutationen liefern. Dabei könnte der TR2-Knock-out-Mausstamm einen Beitrag leisten.

# Zusammenfassung

## **Charakterisierung der Selenoproteine Thioredoxinreduktase 1 und 2 anhand von Knock-out-Mausmodellen**

Thioredoxinreduktasen (TR) sind ubiquitär exprimierte, Selen enthaltende Redoxenzyme, die Zellen durch Reduktion intrazellulärer Substrate vor oxidativem Stress schützen. Durch gezielte Inaktivierung der vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Thioredoxinreduktase 1 (TR1) und der mitochondrialen Thioredoxinreduktase 2 (TR2) im Mausmodell sollten die Funktionen der TR *in vivo* studiert werden. In dieser Arbeit wurden TR1-defiziente Mäuse in Form eines konditionalen Maus-Knock-out-Modells etabliert. Weiterhin wurden die Phänotypen sowohl des TR1- als auch des bereits zuvor etablierten TR2-defizienten Mausstammes beschrieben. Es stellte sich heraus, dass der Mangel einer funktionellen TR1 ebenso wie der Mangel einer funktionellen TR2 zu pränataler Letalität von Mausembryonen führt. Dabei ist ein Überleben der TR1-defizienten Embryonen nur bis zum Tag E9.5 möglich, während die TR2-defizienten Embryonen etwa am Tag E13.0 der Embryonalentwicklung sterben.

TR1-defiziente Embryonen zeigen hochgradige Entwicklungsstörungen in der Organogenese. Die Embryonen erreichen dabei höchstens ein mit Tag E8.5 normal entwickelter Mausembryonen vergleichbares Stadium, wobei die embryonale Drehung nicht vollzogen wird, das Neuralrohr sich nicht vollständig schließt, Kopfstrukturen nicht erkennbar und besonders das Fehlen der Somiten auffällig sind. Die neuronenspezifische Ausschaltung der TR1 führte bei neugeborenen Mäusen zu allgemeiner Wachstumsretardation und Hypoplasie des Kleinhirns mit klinischen Symptomen wie Tremor und Ataxie. Die neuronenspezifisch TR1-defizienten Mäuse erreichten nach bisherigen Untersuchungen höchstens ein Alter von etwa 28 Lebenstagen. TR2-defiziente Embryonen zeigen ebenfalls Rückstände in ihrer Entwicklung. Sie sind ab dem Tag E11.0 der Embryonalentwicklung kleiner

und blasser als ihre Wurfgeschwister. Alle Organe sind in ihrer Differenzierung retardiert. Die beobachtete Dysplasien im Bereich des Herzens und der Leber haben möglicherweise fatale Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der TR2-defizienten Embryonen. Außerdem sind reduzierte Proliferationsraten in der embryonalen Hämatopoese, in Herz- und Lebergewebe beobachtet worden. Zusammengefasst zeigte sich eine wichtige Bedeutung der TR1 für embryonales Wachstum und Organogenese. Weiterhin zeigte sich, dass der Mangel einer funktionellen TR2 möglicherweise primär die mitochondriale Integrität der Zellen schädigt und dadurch sekundär Zellproliferation und Gewebsdifferenzierung beeinträchtigt werden, die ein Überleben der Embryonen unmöglich machen. Bei beiden Knock-out-Maus-Modellen handelt es sich um konditionale Konstrukte, sodass die Funktionen der Thioredoxinreduktasen 1 und 2 zukünftig auch separat in einzelnen Organen studiert werden können.

# Summary

## **Characterization of selenoproteins Thioredoxin Reductase 1 und 2 using knockout mouse models**

Thioredoxin Reductases (TR) are ubiquitously expressed Selenium-containing redox enzymes. By reducing different intracellular substrates they protect cells from oxidative stress. For *mus musculus* two members of the Thioredoxin Reductase gene family have been characterized so far: TR1 and TR2. Whereas the subcellular localization of TR1 is mainly cytoplasmatic, TR2 was only found in mitochondria. The protein functions of TR1 and TR2 were investigated by examining genetically engineered mice. Here I will present the establishment of a conditional TR1-knockout mouse strain and the phenotypical characterization of TR1- and of TR2-knockout mice, that have been established before. Both knockouts, TR1 and TR2, showed to be embryonically lethal. TR1 deficient mouse embryos died at day 9.5, whereas TR2 deficient mouse embryos died around day 13.0 of embryonic gestation. Total deficiency of TR1 leads to strong developmental retardation and malformations in organogenesis mostly affecting the turning of the embryo, closure of neural tube, formation of head structures and formation of somites. Thereby TR1 deficient embryos maximally reach the developmental stage of normal E8.5 wildtype embryos. Neuronal specific TR1 knockout mice show growth retardation and cerebellar hypoplasia. Starting at the postnatal age of 10-14 days they loose weight and show cerebellar ataxia and tremors. Recent results indicate that mice die at the age of approximately 4 weeks. TR2 deficient embryos can already be recognized at embryonic day E11.5 due to a smaller embryo size and paler colour. Mice are retarded in their status of organ differentiation and show malformations in heart and liver development, possibly leading to fatal heart failure or liver insufficiency. Besides that, TR2 deficient embryos show decreased proliferation rates of hematopoietic progenitor cells in the embryonic liver. Taken together these results indicate that TR1 plays an important role in embryonic growth and organogenesis. Besides, deficiency of TR2 is proposed to disturb primarily the integrity of mitochondria and as a consequence

affect processes like cell proliferation and transdifferentiation – leading to embryonic death. The functions of Thioredoxin Reductases 1 and 2 in separate organ systems need to be further analyzed by using conditional ablation strategies.

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , von mRNA abgeleitete DNA
CFU assay	<i>Colony forming units assay</i> (Hämatopoese Funktionstest)
CMV	Cytomegalie Virus
c-myc	<i>cellular myc</i>
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
D1 5'DI	Deiodinase I
D2 5'DII	Deiodinase II
D3 5'DIII	Deiodinase III
del	deletiert ( <i>Knock-out</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
E	Embryonalentwicklungstag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamid-Tetra-Acetat
EKG	Elektrokardiogramm
Epo	Erythropoetin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH	reduziertes FAD
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
G	Guanosin
GMCSF	<i>Granulocytes-Macrophages-Stimulating Factor</i>
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde(n)
HEPA	<i>High Efficiency Particle Arrestance</i>
IFN	Interferon
IFN-β	Interferon Beta
IL3	Interleukin 3
IL6	Interleukin 6
kBp	kilo Basenpaare
L-Dopa	Vorstufe in der Dopamin-Synthese, auch Levodopa bezeichnet
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
min	Minute(n)
myc	<i>myelocytomatosis viral oncogene</i> , virales Onkogen

---

n.u.	nicht untersucht
NAD	Nikotin-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
N-Myc	in Neuroblastomzellen entdecktes Oncogen der myc-Genfamilie
OMIM	Online Mendelian Inheritance of Man
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
<sup>32</sup> P	radioaktiver Phosphor 32
p.a.	pro analysi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphor-gepufferte Kochsalzlösung
p.c.	post coitum
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHGPx	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Sauerstoffradikale
ROS	radikale Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RZPD	Ressourcenzentrum für Genomforschung
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> , Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat (zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen durch H-Brücken-Spaltung)
<sup>75</sup> Se	radioaktives Selen
SECIS	<i>Selenocysteine Insertion Sequence</i>
SeCys	Selenocystein
Sel A	Selenocystein-tRNA-Synthetase
Sel B	spezifischer Elongationsfaktor für Selenocysteininkorporation
Sel C	Selenocystein-spezifische tRNA
Sel D	SECIS-Element
spp.	species
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TR1	Thioredoxinreduktase 1 (zytoplasmatisch)
TR2	Thioredoxinreduktase 2 (mitochondrial)
TR3	Thioredoxinreduktase 3 (hodenspezifisch)
TRIS	a,a,a,-Tris-(hydroxymethyl)methylamin
TRn	Thioredoxinreduktasen
tRNA	Transfer RNA
Trx	Thioredoxin
Trx1	Thioredoxin 1 (vorwiegend zytoplasmatisch)
Trx2	Thioredoxin 2 (vorwiegend mitochondrial)
U	Kürzel Aminosäure Selenocystein
Vit A	Vitamin A
wt	Wildtyp

---

# Literaturverzeichnis

- Abremski, K. and S. Gottesman (1981). "Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda." J Mol Biol **153**(1): 67-78.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Aota, M., K. Matsuda, et al. (1996). "Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin." J Cardiovasc Pharmacol **27**(5): 727-32.
- Arner, E. S. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**(20): 6102-9.
- Arthur, J. R. (2000). "The glutathione peroxidases." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1825-35.
- Bartha, T., S. W. Kim, et al. (2000). "Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene." Endocrinology **141**(1): 229-37.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." Annu Rev Nutr **21**: 453-73.
- Bjorkhem, L., H. Teclebrhan, et al. (2001). "Increased levels of cytosolic thioredoxin reductase activity and mRNA in rat liver nodules." J Hepatol **35**(2): 259-64.
- Bjorkhem-Bergman, L., K. Jonsson, et al. (2002). "Drug-resistant human lung cancer cells are more sensitive to selenium cytotoxicity. Effects on thioredoxin reductase and glutathione reductase." Biochem Pharmacol **63**(10): 1875-84.
- Bock, A., K. Forchhammer, et al. (1991). "Selenocysteine: the 21st amino acid." Mol Microbiol **5**(3): 515-20.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 951-65.
- Brigelius-Flohe, R., C. Muller, et al. (2001). "Functions of GI-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization." Biofactors **14**(1-4): 101-6.
- Brown, K. M. and J. R. Arthur (2001). "Selenium, selenoproteins and human health: a review." Public Health Nutr **4**(2B): 593-9.
- Burke, M. P. and K. Opeskin (2002). "Fulminant heart failure due to selenium deficiency cardiomyopathy (Keshan disease)." Med Sci Law **42**(1): 10-3.
- Clark, L. C., G. F. Combs, Jr., et al. (1996). "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group." Jama **276**(24): 1957-63.
- Combs, G. F., Jr., L. C. Clark, et al. (1997). "Reduction of cancer risk with an oral supplement of selenium." Biomed Environ Sci **10**(2-3): 227-34.
- Conrad, M. (2001). Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) und



- Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx. Fakultät für Biologie. München, Ludwig Maximilians Universität.
- Crane, F. L. (2001). "Biochemical functions of coenzyme Q10." J Am Coll Nutr **20**(6): 591-8.
- Foley, J., T. Ton, et al. (1993). "Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats." Environ Health Perspect **101 Suppl 5**: 199-205.
- Forchhammer, K. and A. Bock (1991). "[Biology and biochemistry of selenium]." Naturwissenschaften **78**(11): 497-504.
- Ganther, H. E. (1999). "Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase." Carcinogenesis **20**(9): 1657-66.
- Gasdaska, J. R., J. W. Harney, et al. (1999). "Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements." J Biol Chem **274**(36): 25379-85.
- Gasdaska, P. Y., M. M. Berggren, et al. (1999). "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase." FEBS Lett **442**(1): 105-11.
- Gladyshev, V. N., K. T. Jeang, et al. (1996). "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6146-51.
- Gorlatov, S. N. and T. C. Stadtman (1998). "Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8520-5.
- Han, H., D. J. Bearss, et al. (2002). "Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray." Cancer Res **62**(10): 2890-6.
- Hatfield, D. L. and V. N. Gladyshev (2002). "How selenium has altered our understanding of the genetic code." Mol Cell Biol **22**(11): 3565-76.
- Heider, M. (1992). Krankheiten des Wirtschaftsgeflügel, Gustav Fischer Verlag.
- Hernandez, A., J. P. Park, et al. (1998). "Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1." Genomics **53**(1): 119-21.
- Hirota, K., M. Murata, et al. (1999). "Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB." J Biol Chem **274**(39): 27891-7.
- Hofmann, B., H. J. Hecht, et al. (2002). "Peroxioredoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-64.
- Hu, J., X. Ma, et al. (2001). "Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-thioredoxin reductase by the Interferon-Retinoid combination." Oncogene **20**(31): 4235-48.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.

- Jakobs, T. C., M. R. Koehler, et al. (1997). "Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33." Genomics **42**(2): 361-3.
- Joyner, S. (1999). Gene Targeting - A Practical Approach. NYU Medical Centre, USA, Institute of Biomolecular Medicine.
- Kaufman, M. H. (1992). The Atlas of Mouse Development. London, San Diego, Harcourt Brace & Company.
- Kawai, H., T. Ota, et al. (2000). "Molecular cloning of mouse thioredoxin reductases." Gene **242**(1-2): 321-30.
- Kelman, Z. (1997). "PCNA: structure, functions and interactions." Oncogene **14**(6): 629-40.
- Kim, Y. S. and J. Milner (2001). "Molecular targets for selenium in cancer prevention." Nutr Cancer **40**(1): 50-4.
- Knoepfler, P. S., P. F. Cheng, et al. (2002). "N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation." Genes Dev **16**(20): 2699-712.
- Kohrle, J. (2000). "The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1853-63.
- Kohrle, J. (2002). "Iodothyronine deiodinases." Methods Enzymol **347**: 125-67.
- Kryukov, G. V., R. A. Kumar, et al. (2002). "Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4245-50.
- Kuhn, R., F. Schwenk, et al. (1995). "Inducible gene targeting in mice." Science **269**(5229): 1427-9.
- Lechner, S., U. Muller-Ladner, et al. (2002). "Bile acids mimic oxidative stress induced upregulation of thioredoxin reductase in colon cancer cell lines." Carcinogenesis **23**(8): 1281-8.
- Lescure, A., C. Allmang, et al. (2002). "cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2." Gene **291**(1-2): 279-85.
- Lescure, A., D. Fagegaltier, et al. (2002). "Protein factors mediating selenoprotein synthesis." Curr Protein Pept Sci **3**(1): 143-51.
- Lescure, A., D. Gautheret, et al. (1999). "Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif." J Biol Chem **274**(53): 38147-54.
- Lindner, D. J., X. Ma, et al. (2002). "Thioredoxin reductase plays a critical role in IFN retinoid-mediated tumor-growth control in vivo." Clin Cancer Res **8**(10): 3210-8.
- Low, S. C. and M. J. Berry (1996). "Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes." Trends Biochem Sci **21**(6): 203-8.
- Ma, X., J. Hu, et al. (2002). "Mutational analysis of human thioredoxin reductase 1. Effects on p53-mediated gene expression and interferon and retinoic acid-induced cell death." J Biol Chem **277**(25): 22460-8.
- Ma, X., S. Karra, et al. (2001). "Thioredoxin participates in a cell death pathway induced by interferon and retinoid combination." Oncogene **20**(28): 3703-15.

- Maynard, T. M., G. T. Haskell, et al. (2002). "22q11 DS: genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome." Int J Dev Neurosci **20**(3-5): 407-19.
- McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, J. H. U. a. N. C. f. B. I., National Library of Medicine (2000). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Baltimore, Bethesda, MD, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Minamisawa, S., Y. Gu, et al. (1999). "A post-transcriptional compensatory pathway in heterozygous ventricular myosin light chain 2-deficient mice results in lack of gene dosage effect during normal cardiac growth or hypertrophy." J Biol Chem **274**(15): 10066-70.
- Miranda-Vizuet, A., A. E. Damdimopoulos, et al. (1999). "cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1)." Biochim Biophys Acta **1447**(1): 113-8.
- Moghadaszadeh, B., N. Petit, et al. (2001). "Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome." Nat Genet **29**(1): 17-8.
- Moos, P. J., K. Edes, et al. (2002). "Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox sensitive transcription factors p53 and HIF by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase." J Biol Chem.
- Moskovitz, J., H. Weissbach, et al. (1996). "Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2095-9.
- Mostert, V. (2000). "Selenoprotein P: properties, functions, and regulation." Arch Biochem Biophys **376**(2): 433-8.
- Mustacich, D. and G. Powis (2000). "Thioredoxin reductase." Biochem J **346 Pt 1**: 1-8.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.
- Nakamura, H., L. A. Herzenberg, et al. (2001). "Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15143-8.
- Neuhierl, B., M. Thanbichler, et al. (1999). "A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation." J Biol Chem **274**(9): 5407-14.
- Nicklas, W., P. Baneux, et al. (2002). "Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units." Lab Anim **36**(1): 20-42.
- Nishinaka, Y., H. Nakamura, et al. (2002). "Thioredoxin cytokine action." Methods Enzymol **347**: 332-8.
- Nonn, L., R. R. Williams, et al. (2003). "The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice." Mol Cell Biol **23**(3): 916-22.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-312.
- Osborne, S. A. and K. F. Tonissen (2001). "Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes." BMC Genomics **2**(1): 10.

- Oster, O. (1992). Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland, Universitätsverlag Jena.
- Oster, S. K., C. S. Ho, et al. (2002). "The myc oncogene: Marvelously Complex." Adv Cancer Res **84**: 81-154.
- Pasparakis, M., G. Courtois, et al. (2002). "TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2." Nature **417**(6891): 861-6.
- Poole, L. B., C. M. Reynolds, et al. (2000). "AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**(20): 6126-33.
- Rhee, S. G., S. W. Kang, et al. (2001). "Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases." IUBMB Life **52**(1-2): 35-41.
- Rundlof, A. K., M. Carlsten, et al. (2000). "Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5' untranslated region." Biochem J **347 Pt 3**: 661-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-70.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-212.
- Schallreuter, K. U., G. Buttner, et al. (1994). "Cytotoxicity of 6-biopterin to human melanocytes." Biochem Biophys Res Commun **204**(1): 43-8.
- Schomburg, L., U. Schweizer, et al. (2003). "Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues." Biochem J **370**(Pt 2): 397-402.
- Schuhmacher, M., F. Kohlhuber, et al. (2001). "The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc." Nucleic Acids Res **29**(2): 397-406.
- Schwarz, K. and C. M. Foltz (1999). "Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951." Nutrition **15**(3): 255.
- Schwenk, F., U. Baron, et al. (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells." Nucleic Acids Res **23**(24): 5080-1.
- St Germain, D. L. and V. A. Galton (1997). "The deiodinase family of selenoproteins." Thyroid **7**(4): 655-68.
- Sudre, P. and F. Mathieu (2001). "Kashin-Beck disease: from etiology to prevention or from prevention to etiology?" Int Orthop **25**(3): 175-9.
- Sun, Q. A., Y. Wu, et al. (1999). "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases." J Biol Chem **274**(35): 24522-30.
- Suppmann, S., B. C. Persson, et al. (1999). "Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome." Embo J **18**(8): 2284-93.

- Tanaka, T., F. Hosoi, et al. (2002). "Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis." Embo J **21**(7): 1695-703.
- Thompson, J. N. and M. L. Scott (1970). "Impaired lipid and vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks." J Nutr **100**(7): 797-809.
- Tinggi, U. (2003). "Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review." Toxicol Lett **137**(1-2): 103-10.
- Tronche, F., C. Kellendonk, et al. (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." Nat Genet **23**(1): 99-103.
- Tujebajeva, R. M., P. R. Copeland, et al. (2000). "Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion." EMBO Rep **1**(2): 158-63.
- Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1997). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme?" Biomed Environ Sci **10**(2-3): 327-32.
- Walczak, R., N. Hubert, et al. (1997). "Solution structure of SECIS, the mRNA element required for eukaryotic selenocysteine insertion--interaction studies with the SECIS-binding protein SBP." Biomed Environ Sci **10**(2-3): 177-81.
- Ward, M., Maronpot, Sundberg (2000). Pathology of Genetically Engineered Mice. Ames, Iowa State University Press.
- Williams, C. H., Jr. (2000). "Thioredoxin-thioredoxin reductase--a system that has come of age." Eur J Biochem **267**(20): 6101.
- Wingler, K. and R. Brigelius-Flohe (1999). "Gastrointestinal glutathione peroxidase." Biofactors **10**(2-3): 245-9.
- Wonsey, D. R., K. I. Zeller, et al. (2002). "The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6649-54.
- Xia, L., T. Nordman, et al. (2002). "The mammalian selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress." J Biol Chem.
- Yoshimura, S., H. Suemizu, et al. (1994). "The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32." Gene **145**(2): 293-7.
- Zhong, L. and A. Holmgren (2000). "Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations." J Biol Chem **275**(24): 18121-8.



# Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Entstehungszeit dieser Arbeit unterstützten.

Dr. Marcus Conrad für die hervorragende ständige Betreuung, Diskussion und Korrektur meiner Arbeit und die vorzügliche Arbeitsgemeinschaft.

Dr. Markus Brielmeier für seine Betreuung, ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Angelegenheiten.

Prof. Dr. G. W. Bornkamm für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Antonis Hatzopoulos und Dr. Heike Beck für die sehr fruchtbare Kooperation und Stefanie Lippl für Assistenz in allen Bereichen.

Dr. Wolfgang Wurst und technische Mitarbeiter am Institut für Entwicklungs-genetik, GSF Neuherberg, für die ausgezeichnete und fruchtbare Kooperation.

Prof. Dr. W. Schmahl und technische Mitarbeiter am Institut der Tierpathologie der Universität München, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, für die Betreuung dieser Arbeit, tatkräftige Unterstützung in pathologischen Fragen und große Hilfsbereitschaft.

Dr. Ulrich Heinzmann und technischen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, GSF Neuherberg, für die fruchtbare Kooperation.

Prof. Dr. J. Schmidt, Abteilung für Vergleichende Medizin der GSF Neuherberg, für hervorragende fachliche und praktische Unterstützung.

Dr. Lutz Ruprecht für Diskussionen in Fragen des Tierschutzes.

Dr. Marius Ueffing für die Unterstützung im Labor und Dr. Matthias Bauer für das Lesen der Arbeit und allen gemeinsam mit Dr. Sabine Suppmann und Stefanie Hauck geführten interessanten Diskussionen.

Ana Banjac für ganz besondere Freundschaft, Dr. Stephanie Moreno für ihre Hilfsbereitschaft und Manuela Schneider für gute Zusammenarbeit.

Martin Schlee, Dr. Jean Marie Beché, Dr. Gerhard Laux, Dr. Dirk Eick, Michael Hölzel, Dr. Rob Chapman, Andreas Lang, Dr. Diana Dudziak, Gabriele Marschall, Dr. Jürgen Bachl und Isabel Schlosser für viele verschiedenste Dinge, v.a. für die gute Arbeitsatmosphäre im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik.

Dr. Volker Mostert für persönliche Diskussionen auf dem Gebiet der Selenoproteine.

Rosina Pfeiffer und Theresia Wandrowetz für ausgezeichnete Pflege der Tiere.



# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE INFORMATION

---

Alter: geboren am 12.06.1972 als dritte von drei Schwestern  
Geburtsort: München, Deutschland  
Eltern: Vater Tolemisch Jakupoglu, Journalist, geboren in Narin, Kirgisistan  
und Mutter Maire Jakupoglu, Journalistin, geborene Körbekli, Tartarin aus  
Kefe/Krim

## AUSBILDUNG

---

1978 – 1982 Grundschule in München  
1982 - 1990 Musisches Pestalozzi-Gymnasium München  
1990 - 1991: Oberstufenrealgymnasium Klagenfurt / Österreich, Abschluß:  
Matura im Juni 1991  
1992 - 1996 Studium der Tiermedizin an der veterinärmedizinischen  
Universität Wien / Österreich  
Studienortwechsel  
1996 - 2000 Fortsetzung des Studium der Tiermedizin an der Ludwig  
Maximilians Universität München und Approbation als Tierärztin

## FORTBILDUNG

---

September 2001 Zweiwöchiger „Versuchstierkundlicher Kurs“,  
Tierschutzinformationszentrum für die biomedizinische Forschung,  
München  
September 2001 Zweiwöchiger Kurs “EMBO Practical Course on Mouse  
Genome Engineering by Site-specific Recombinases”, Braunschweig  
April 2002 Einwöchiger Kurs “European Course on Pathology of  
Genetically Engineered Mice”, Nantes, Frankreich

## BERUFSERFAHRUNG

---

2000 - 2003 Promotionsstudentin, Wissenschaftliche Hilfskraft  
GSF München, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

## BESONDERE INTERESSEN

---

Mitglied des Orchestervereins „Wilde Gungl“ e.V. als Violinistin